



10/533, 928
PCT/FR 03/03335
Recu PCT/PTO 05 MAY 2005

MAILED 26 JAN 2004

WIPO PCT

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 2 NOV. 2003

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1a) OU b)

BEST AVAILABLE COPY

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr



26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354*03

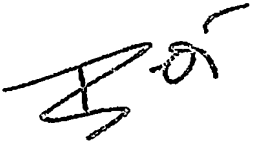

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE page 1/2



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire DB 510 e 1 / 210502

REMISE DES PIÈCES DATE 8 NOV 2002 LIEU 75 INPI PARIS B N° D'ENREGISTREMENT 0214078 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI - 8 NOV. 2002		NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE CABINET ORES 6, avenue de Messine 75008 PARIS	
Vos références pour ce dossier (facultatif) VCcagF1578/1 FR			
Confirmation d'un dépôt par télécopie		<input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie	
2 NATURE DE LA DEMANDE		Cochez l'une des 4 cases suivantes	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
Demande de brevet initiale		N° _____ Date _____	
ou demande de certificat d'utilité initiale		N° _____ Date _____	
Transformation d'une demande de brevet européen		<input type="checkbox"/>	
Demande de brevet initiale		N° _____ Date _____	
3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) NOUVEAUX DERIVES AMPHIPHILES DE L'ALPHA-C-PHENYL-N-tert-BUTYL NITRONE.			
4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ Pays ou organisation _____ N° _____ <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)		<input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique	
Nom ou dénomination sociale Prénoms Forme juridique N° SIREN Code APE-NAF Domicile ou siège Rue Code postal et ville Pays Nationalité N° de téléphone (facultatif) Adresse électronique (facultatif)		SALLES Jean-Pierre agissant au nom et pour le compte de la Société dénommée TS PHARMA, Société en cours de formation. 830 Chemin de Vergon 11 3 5 1 0 EGUILLES FRANCE Française N° de télécopie (facultatif)	
<input checked="" type="checkbox"/> S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»			

Remplir impérativement la 2^{ème} page

REMISE DES PIÈCES DATE 07 NOV 2002 LIEU 75 INPI PARIS 8 N° D'ENREGISTREMENT 0214078 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		Réservé à l'INPI	
6 MANDATAIRE (N/Alien) Nom Prénom Cabine* ou Société N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel Adresse Rue Code postal et ville Pays N° de téléphone (facultatif) N° de télécopie (facultatif) Adresse électronique (facultatif)		ORES Béatrice CABINET ORES 6, avenue de Messine 75 008 PARIS FRANCE 01 45 62 75 00 - 01 45 62 69 99 01 45 62 04 86 - 01 45 62 04 87	
7 INVENTEUR(S) Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes		Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques <input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'Inventeur(s)	
8 RAPPORT DE RECHERCHE Établissement immédiat ou établissement différé		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation) <input checked="" type="checkbox"/>	
Paiement échelonné de la redevance (en deux versements)		Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requis pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence): RG	
10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS Le support électronique de données est joint La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe		<input type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences <input type="checkbox"/>	
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes			
11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) Béatrice ORES N° 92-4046		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI  	



26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ
Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354*03

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Page suite N° 1.../1...

BR/SUITE

Réserve à l'INPI	
REMISE DES PIÈCES DATE 09 NOV 2002 LIEU 75 INPI PARIS B N° D'ENREGISTREMENT 0214073 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI	
Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire DB 629 W / 010702	
Vos références pour ce dossier (facultatif) VCcagF1578/1 FR	
4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE	
Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____	
5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases) <input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique	
Nom ou dénomination sociale UNIVERSITE D'AVIGNON ET DES PAYS DU VAUCLUSE	
Prénoms _____	
Forme juridique _____	
N° SIREN _____	
Code APE-NAF _____	
Domicile ou siège	Rue 74, rue Louis Pasteur
	Code postal et ville 18 4 0 2 9 AVIGNON CEDEX 1
	Pays FRANCE
Nationalité Française	
N° de téléphone (facultatif) _____	
N° de télécopie (facultatif) _____	
Adresse électronique (facultatif) _____	
5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases) <input type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique	
Nom ou dénomination sociale _____	
Prénoms _____	
Forme juridique _____	
N° SIREN _____	
Code APE-NAF _____	
Domicile ou siège	Rue _____
	Code postal et ville _____
	Pays _____
Nationalité _____	
N° de téléphone (facultatif) _____	
N° de télécopie (facultatif) _____	
Adresse électronique (facultatif) _____	
11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) Béatrice ORES N° 92-4046	
VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI 	

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire.
Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI

L'invention a pour objet de nouveaux composés, dérivés de l' α -C-phényl-*N-tert*-butyl nitroxe, un procédé pour leur préparation et leur utilisation pour la préparation de médicaments destinés à prévenir ou traiter les maladies liées au stress oxydatif.

5 Les pathologies liées au stress oxydatif et à la formation des espèces radicalaires oxygénées ont été répertoriées par Croos C.E., *Arch. Intern. Med.* (1987) 107, 526-545 et par Anderson K.M., Ellis G., Bonomi P., Harris J.E., *Medical Hypotheses* (1999) 52, 53-57.

10 Elles sont nombreuses : plus de 70 pathologies de ce type sont citées dans cette liste qui inclut notamment les maladies immunitaires et inflammatoires, le syndrome d'ischémie-reperfusion, l'athérosclérose, les maladies d'Alzheimer et de Parkinson, les lésions dues aux radiations UV et ionisantes, certaines formes de carcinogenèse chimique ainsi que le vieillissement cellulaire.

15 Les espèces radicalaires oxygénées et nitrogénées (ROS et RNS) sont produites naturellement dans l'organisme et leur régulation est assurée par certaines enzymes spécialisées comme la Super Oxyde Dismutase soluble (SODs). Le piégeage de ces espèces radicalaires extrêmement réactives est vital car elles occasionnent des dégâts irréversibles dans la cellule. Si la production normale de ces espèces radicalaires est régulée facilement par la cellule, une surproduction de radicaux libres liée à un stress

20 oxydatif externe (choc inflammatoire, syndrome d'ischémie-reperfusion, ...) ou une déficience génétique (anomalie mitochondriale notamment) entraîne une dégradation cellulaire rapide. La prise en charge de cet important flux de radicaux par l'organisme humain ou animal devient dès lors impossible.

25 Il existe plusieurs mécanismes de défense contre le stress oxydatif de la cellule susceptibles de s'exercer à différents niveaux de la cascade oxydative. Celle-ci est initiée généralement par la surproduction de radicaux superoxyde liée à une réduction partielle de l'oxygène moléculaire dans la mitochondrie (syndrome typique de l'ischémie-reperfusion). Ce radical superoxyde peut se dismuter en eau oxygénée. Ces deux espèces, par l'intermédiaire de la réaction de Fenton, en présence de fer ferreux, peuvent donner des
30 radicaux hydroxyle qui ont la particularité de réagir très rapidement et de manière non spécifique avec n'importe lequel des composants de la cellule comme les lipides, l'ADN ou les protéines, causant des dommages irréversibles parmi ceux-ci, comme cela a été décrit par Stadtman H.R., Berlett B.S. *J. Biol. Chem.* (1991) 266, 17201-17211 ; Floyd R.A. *Carcinogenesis* (1990) 11, 1447-1450 ; Gille J.J., Van Berkel C.G., Joenge H.
35 *Carcinogenesis* (1994) 15, 2695-2699 ; Halliwell B. *Mutat. Res.* (1999) 443, 37-52.

Ces espèces radicalaires en activant certains gènes suicides (gènes Bcl ou p53) par l'intermédiaire du facteur NF-kB sont également à l'origine du phénomène

d'apoptose cellulaire qui a été décrit par Siebenlist U., Franzoso G., Brown K. *Annu. Rev. Cell. Biol.* (1994) 10, 405-455.

5 La SOD soluble est chargée de convertir le radical superoxyde en eau oxygénée, celle-ci étant ensuite prise en charge par des catalases ou des peroxydases glutathion dépendantes.

Il existe d'autres niveaux de protection cellulaires contre les oxydants notamment au niveau de la membrane, qui permettent de limiter l'oxydation des phospholipides membranaires insaturés. L' α -tocophérol et le β -carotène sont les principaux exemples d'antioxydants lipidiques.

10 La stratégie la plus prometteuse, dans la recherche d'une thérapie destinée à prévenir ou traiter les maladies liées au stress oxydatif, consiste à intervenir le plus en amont possible de cette cascade oxydative, afin de prévenir très tôt les dommages liés à la très forte réactivité des espèces radicalaires.

Pour cela on a cherché à piéger ces radicaux libres hautement réactifs par l'intermédiaire de molécules dites « spin-trap » ou « piège à spin », parmi lesquelles les nitrones apparaissent comme les plus efficaces.

L'effet thérapeutique des nitrones dans la réduction et la prévention des dommages causés par les radicaux libres dans les systèmes biologiques a été mis en évidence en 1990 par Oliver C., Starke-Read P., Stadman E., Liu G., Carney J., Floyd R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1990) 87, 5144-5147.

20 Ces auteurs ont pu démontrer une diminution des dommages causés par une ischémie cérébrale après injection de l' α -C-phényl-*N*-tert-butyl nitrone (PBN) chez les gerbilles. Les ischémies cérébrales sont accompagnées d'une forte augmentation de la production de radicaux libres qui ont été piégés par la PBN pour former des adduits de spin bien plus stables donc moins réactifs et toxiques. La PBN est le spin trap qui a fait l'objet du plus grand nombre d'études biologiques.

On peut par exemple se reporter à Hensley K., Carney J.M., Stewart C.A., Tabatabaie T., Pye Q.N., Floyd R.A. *Int. Rev. Neurobiol.* (1997) 40, 229-317.

30 Elle possède une grande spécificité d'action cérébrale probablement en raison de son hydrophobie importante qui lui permet de franchir la barrière hémato-méningée, comme cela a été montré par Cheng H.Y., Liu T., Feuerstein G., Barone F.C. *Free Radic. Biol. Med.* (1993) 14, 243-250.

Parmi les nitrones, les plus connus et les plus efficaces sont les α -C-phényl-*N*-tert-butyl nitrone (PBN), les 5,5-diméthylpyrrolidine-*N*-oxyde (DMPO) et des molécules découvertes plus récemment : la *N*-benzylidène-1-diéthoxyphosphoryl-1-méthyléthylamine *N*-oxyde (PBNP) et la 5-diéthyl-phosphono 5-méthyl pyrroline-*N*-oxyde (DEPMPO).

On peut également citer un dérivé disulfonate de la PBN, le NXY-059 (disodium 4-[(tert-butylimino)-méthylbenzene-1,3-disulfonate *N*-oxyde) possédant une activité neuroprotectrice supérieure à la PBN et qui est en cours d'étude pharmacologique et de développement clinique :

Kuroda S., Tsuchidate R., Smith M.L., Maples K.R., Siesjo B.K. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* (1999) **19**, 778-787 ;

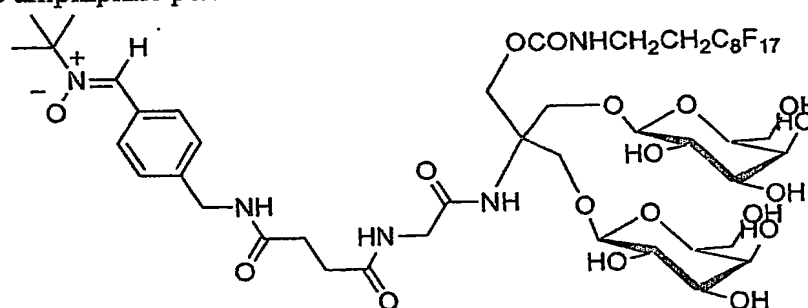
Lees K.R., Sharma A.K., Barer D., Ford G.A., Kostulas V., Cheng Y.F., Odergren T. *Stroke* (2001) **32**, 675-680.

Toutefois, aucune des molécules citées ci-dessus ne possède une efficacité *in vivo* ou *ex vivo* satisfaisante à faible dose, même si leur concentration cytotoxique est très élevée : Almli L.M., Hamrick S.E.G., Koshy A.A., Täuber M.G., Ferriero D.M. *Dev. Brain Res.* (2001) **132**, 121-129 ; Nakao N., Grasbon-Frodl E.M., Widner H., Brundin P. *Neuroscience* (1996) **73**, 185-200. Ce manque d'efficacité est probablement lié à une mauvaise biodisponibilité de la drogue et à un problème de pénétration cellulaire.

Il subsiste donc le besoin d'une molécule de type spin trap, ou piège à spin, capable de piéger des radicaux libres, et qui soit également susceptible d'être acheminée par l'organisme humain ou animal jusqu'à sa cible au niveau intracellulaire.

En particulier, une molécule capable de traverser la membrane cellulaire et, challenge encore plus important et difficile, la membrane mitochondriale afin d'entrer dans le compartiment où est produit le radical superoxyde.

Dans ce but, Ouari O., Polidori A., Pucci B., Tordo P., Chalier F. *J. Org. Chem.* (1999) **64**, 3554-3556 et Geromel V., Kadhon N., Cebalos-Picot I., Ouari O., Polidori A., Munnich A., Rötig A., Rustin P. *Hum. Mol. Genet.* (2001) **10**, 1221-1228, ont proposé un dérivé amphiphile perfluorocarboné de la PBN : la TA1PBN.



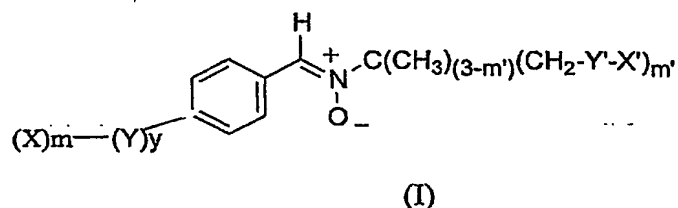
TA1PBN

Cette molécule a été testée sur des lignées cellulaires de fibroblastes souffrant d'un sévère déficit d'activité du complexe V de la chaîne respiratoire (ATPase) et elle a donné des résultats encourageants.

Cependant, la synthèse de la TA1PBN présente des difficultés qui rendent sa production à l'échelle industrielle difficilement envisageable.

Aussi, la Demanderesse s'est fixée pour objectif la conception et la fabrication de nouvelles molécules, ayant une activité de spin trap ou piège à spin, présentant une biodisponibilité accrue par rapport aux molécules de l'art antérieur et dont la préparation soit simple et permette d'envisager une production à l'échelle industrielle.

L'invention a pour objet de nouvelles molécules, caractérisées en ce qu'elles répondent à la formule (I) ci-dessous :



dans laquelle :

X représente un groupement hydrophile choisi parmi un mono ou un polysaccharide, ainsi que les dérivés aminés de mono et de polysaccharides, une chaîne polyoxyde d'éthylène, une chaîne peptidique, un groupement polaire ionique choisi parmi un ammonium quaternaire, un oxyde d'amine, un groupement carnitine ;

m représente un entier égal à 1, 2 ou 3 ;

Y représente un bras espaceur destiné à relier le noyau aromatique et les substituants hydrophiles X ;

Y est choisi parmi les fonctions ester, amide, urée, uréthane, éther, thio-éther, amine, les chaînes hydrocarbonées en C₁-C₆, éventuellement interrompues par une ou plusieurs fonctions ester, amide, urée, uréthane et par un ou plusieurs ponts éther, amine ou thio-éther ;

y représente un entier égal à 0 ou à 1 ;

Y' représente un groupement choisi parmi une fonction ester $-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-$, une fonction amide $-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-$, une fonction urée $-\text{HN}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}-$, une fonction uréthane $-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}-$, un pont éther $-\text{O}-$, un pont thio-éther $-\text{S}-$;

m' est un entier choisi parmi 1 et 2 ;

X' représente un atome d'hydrogène ou une chaîne alkyle en C₄-C₁₄ éventuellement substituée par un ou plusieurs atomes de fluor.

Parmi les mono-saccharides utilisables dans la présente invention, on peut citer : le glucose, le lactose, le fructose, le mannose, le galactose, le ribose, le maltose.

Parmi les dérivés aminés de sucres, on peut citer notamment la glucosamine. Parmi les polysaccharides utilisables dans la présente invention, on peut citer les chaînes constituées de plusieurs unités monosaccharide comme par exemple : le saccharose et le lactobionamide.

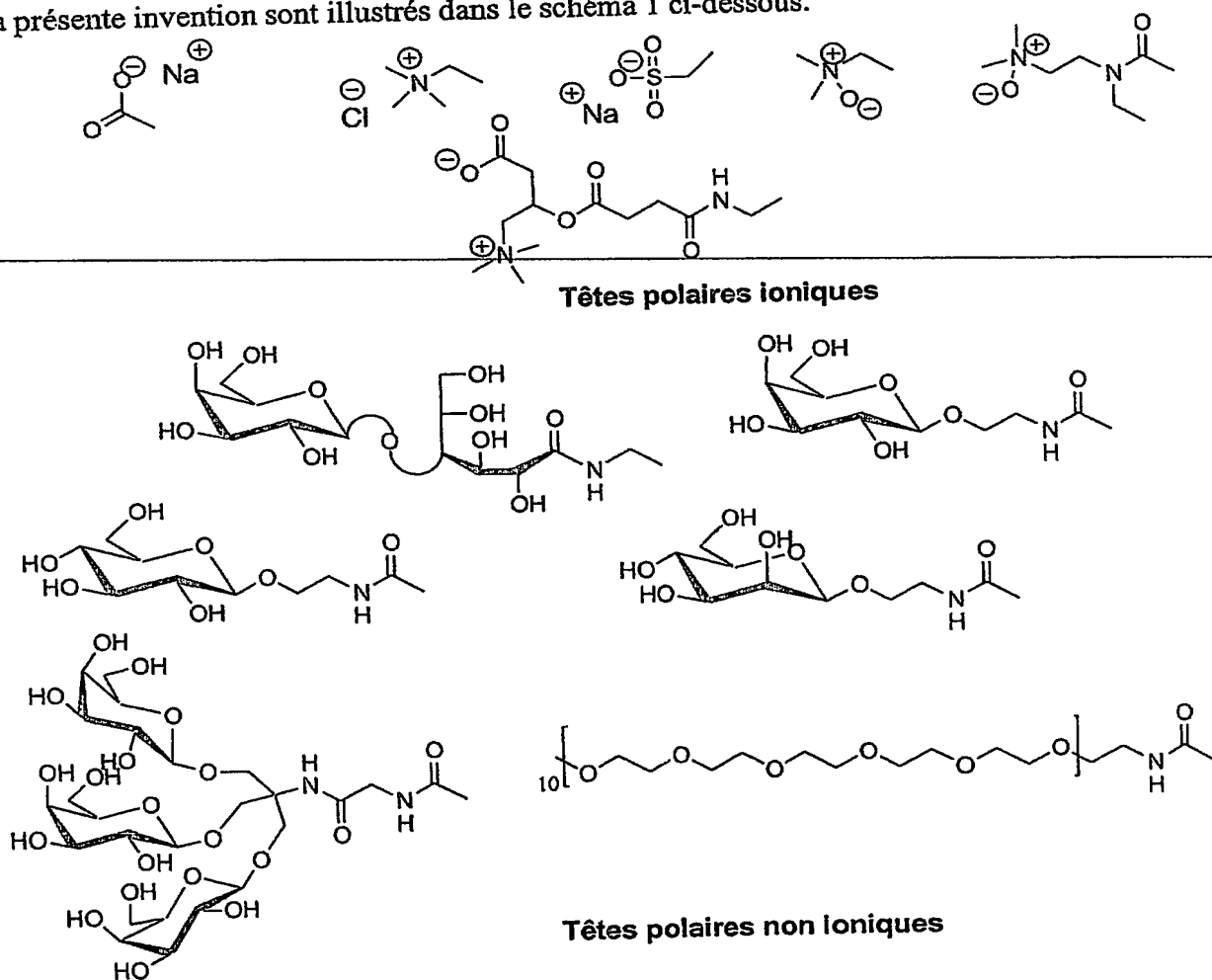
5

Lorsque la partie hydrophile X de la molécule de formule (I) est une chaîne polyoxyde d'éthylène, celle-ci comprend avantageusement de 30 à 100 unités oxyde d'éthylène, de préférence de 50 à 60 unités.

10

De préférence la chaîne peptidique est constituée d'acides aminés naturels comme l'alanine, l'arginine, l'asparagine, l'acide aspartique, la cystéine, la glutamine, l'acide glutamique, la glycine, l'histidine, l'isoleucine, la leucine, la lysine, la méthionine, la phénylalanine, la proline, la sérine, la thréonine, le tryptophane, la tyrosine, la valine.

Des groupements hydrophiles ioniques ou non ioniques utilisables dans la présente invention sont illustrés dans le schéma 1 ci-dessous.



15

Schéma 1 : structure générale des têtes polaires

En fonction de la mono ou de la plurifonctionnalité du bras espaceur Y, celui-ci est substitué une ou deux fois par le groupement X.

Le groupement X' peut par exemple être choisi parmi les radicaux
5 suivants :

- radicaux hydrocarbonés : le n-butyle, le ter-butyle, l'isobutyle, le n-pentyle, l'isopentyle, le n-hexyle, le n-heptyle, le n-octyle, le n-nonyle, le n-décyle, le n-undécyle, le n-dodécyle, le n-tridécylo, le n-tétradécyle...

- radicaux hydrocarbonés fluorés : on peut citer ceux répondant à la
10 formule $-(CH_2)_r-(CF_2)_tF$, dans laquelle r et t représentent deux entiers avec : $14 \geq r+t \geq 4$, tels que par exemple :

$-(CF_2)_4F$; $-(CF_2)_5F$; $-(CF_2)_6F$; $-(CF_2)_7F$; $-(CF_2)_8F$; $-(CF_2)_9F$; $-(CF_2)_{10}F$; $-(CF_2)_{11}F$; $-(CF_2)_{12}F$; $-(CF_2)_{13}F$; $-(CF_2)_{14}F$; $-CH_2-(CF_2)_3F$; $-CH_2-(CF_2)_4F$; $-CH_2-(CF_2)_5F$; $-CH_2-(CF_2)_6F$; $-CH_2-(CF_2)_7F$; $-CH_2-(CF_2)_8F$; $-CH_2-(CF_2)_9F$; $-CH_2-(CF_2)_{10}F$; $-CH_2-(CF_2)_{11}F$; $-CH_2-(CF_2)_{12}F$; $-CH_2-(CF_2)_{13}F$; $-(CH_2)_2-(CF_2)_2F$; $-(CH_2)_2-(CF_2)_3F$; $-(CH_2)_2-(CF_2)_4F$; $-(CH_2)_2-(CF_2)_5F$; $-(CH_2)_2-(CF_2)_6F$; $-(CH_2)_2-(CF_2)_7F$; $-(CH_2)_2-(CF_2)_8F$; $-(CH_2)_2-(CF_2)_9F$; $-(CH_2)_2-(CF_2)_{10}F$; $-(CH_2)_2-(CF_2)_{11}F$; $-(CH_2)_2-(CF_2)_{12}F$; $-(CH_2)_3-(CF_2)_1F$; $-(CH_2)_{13}-(CF_2)F$.

20 De façon préférentielle, l'une ou moins des conditions ci-dessous est satisfaite :

X représente un groupement lactobionamide, carnitine ou une chaîne polyoxyéthylène ;

m représente 1 ;

25 m' représente 1 ou 2 ;

X' est choisi parmi octyl, décyl, dodécyl, $CF_3(CF_2)_rCH_2CH_2-$
 $8 \leq r \leq 6$

Les composés de l'invention présentent l'avantage, par rapport aux composés de l'art antérieur, d'être dotés d'une biodisponibilité améliorée. Cette
30 biodisponibilité améliorée est au moins en partie attribuable au caractère amphiphile des molécules de l'invention.

L'invention a également pour objet un procédé de préparation des composés répondant à la formule (I), ce procédé étant caractérisé en ce que l'on fait réagir un aldéhyde répondant à la formule (II) avec une hydroxylamine répondant à la formule
35 (III) suivant le schéma 2 ci-dessous :

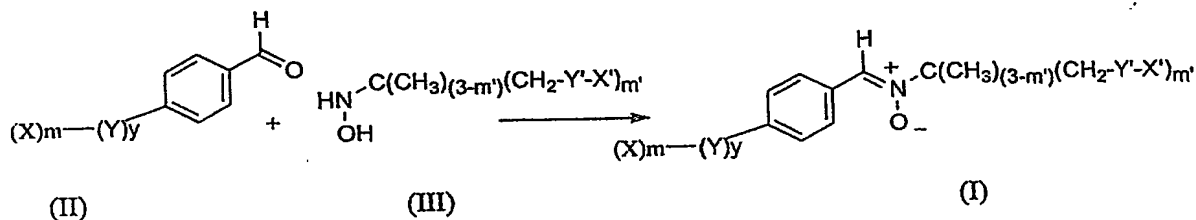


Schéma 2

dans lequel X, y, Y, m, X', m' et Y' ont la même définition que ci-

5 dessus.

Les composés de formule (III) sont préparés suivant un procédé décrit dans le schéma 3 ci-dessous :

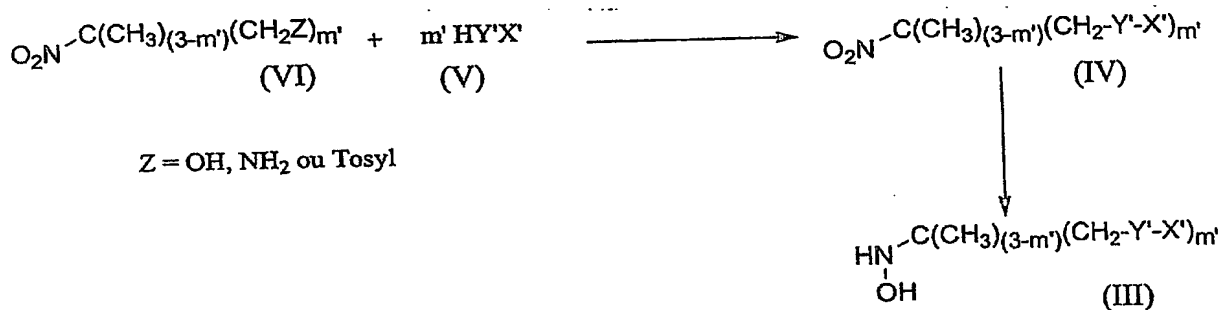


Schéma 3

10

En fonction de la nature du groupement lipophile, le schéma 3 est mis en œuvre dans des conditions qui seront exposées ci-dessous.

a- Partie hydrophobe monocaténaire hydro ou perfluorocarbonée

(Figure 1) :

15

La figure 1 illustre la préparation des composés de formule (III) avec :

m' = 1 ;

X' = (CH₂)₂-R avec R = C₆F₁₃, C₈F₁₇, CH₃(CH₂)_n

4 < n < 14 ;

Y' = $\text{HN} \text{---} \overset{\text{O}}{\parallel} \text{C} \text{---}$ (composé 5), $\text{---NH} \text{---} \overset{\text{O}}{\parallel} \text{C} \text{---NH} \text{---}$ (composé 6), $\text{O} \text{---} \overset{\text{O}}{\parallel} \text{C} \text{---NH}$ (composé 2), $\text{O} \text{---} \overset{\text{O}}{\parallel} \text{C} \text{---}$ (composé 1), $\text{---S} \text{---}$ (composé 7) ;

20

La partie hydrophobe monocaténaire est synthétisée à partir du 2-méthyl 2-nitro propanol. La fonction alcool de ce synthon permet de greffer les chaînes hydro et perfluorocarbonées directement par l'intermédiaire de liaisons ester par réaction de l'alcool et de l'acide en présence d'un agent de couplage, la dicyclohexylcarbodiimide et de

25 dimethyl aminopyridine (1).

L'alcool peut également réagir avec un isocyanate d'alkyle, pour donner des liaisons de type uréthane (2).

La fonction alcool peut être convertie en amine par tosylation suivie d'une substitution par l'azoture de sodium. Par réaction de Staudinger, l'azoture d'alkyle est transformé en amine en présence de triphényl phosphine et de soude.

Cette amine peut réagir avec un acide gras pour donner une liaison de type amide (5) ou avec un isocyanate d'alkyle pour former une urée (6).

Enfin, le tosylate peut être substitué en milieu basique par un thiol pour former une liaison thioéther (7).

La fonction nitro des différents synthons hydrophobes (1-7) est ensuite réduite en hydroxylamine par l'intermédiaire de 4 équivalents du réactif de Kagan (SmI2) dans un mélange THF/McOH ou dans l'acide acétique.

Cette réaction a été décrite par Girard P., Namy J.L., Kagan H.B. *J. Am. Chem. Soc.* (1980) 102, 2693-2698 et Namy J.L., Girard P., Kagan H.B. *Nouv. J. Chem.* (1977) 1, 5.

La réaction très rapide (3min.) est réalisée avec un rendement variant entre 50 et 100% selon la nature du nitroalkyle à réduire.

b- Partie hydrophobe bicaténaire hydro ou perfluorocarbonée (Figure 2) :

La figure 2 illustre la préparation des composés de formule (III) avec :

$m' = 2$;

$X' = (CH_2)_2-R$ avec $R = C_6F_{13}, C_8F_{17}, CH_3(CH_2)_n$

$4 < n < 14$;

$Y' = O-\overset{\overset{O}{\parallel}}{C}-$ (composé 8), $O-\overset{\overset{O}{\parallel}}{C}-NH$ (composé 9), $-S-$ (composé

12), $-NH-\overset{\overset{O}{\parallel}}{C}-NH-$ (composé 14), $HN-\overset{\overset{O}{\parallel}}{C}-$ (composé 13).

Les parties hydrophobes bicaténaires sont synthétisées à partir du 2-nitro-2-méthyl-1,3-propanediol. Les chaînes grasses sont fixées sur les fonctions alcool par des liaisons uréthane (9) ou ester (8). Les fonctions alcool sont transformées en tosylate par réaction sur le chlorure de tosyloyle. Le ditosylate peut être substitué par un alkyl mercaptan pour donner un thioéther (12). Ce ditosylate peut être transformé en diamine par substitution du tosylate par l'azoture de sodium et réaction avec la triphényl phosphine et hydrolyse basique. Cette diamine peut réagir avec un isocyanate pour donner une liaison urée (14) ou un acide pour former une liaison amide (13).

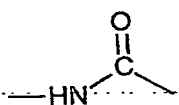
La fonction nitro des synthons biantennés est ensuite réduite par le réactif de Kagan avec un rendement pouvant varier de 60 à 80% en fonction de la molécule concernée.

c- Partie hydrophile non ionique (Figure 3) :

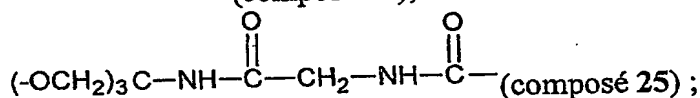
La figure 3 illustre la préparation des composés de formule (II) dans laquelle :

X représente un groupement polaire non ionique ;

5 Y représente $-\text{NH}-\text{CH}_2-$ (composé 20), $-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-$
(composés 21, 22, 23),



(composé 24),



y = 1 ;

10 m = 1 (composés 20 à 24) ;

m = 3 (composé 25)

Les têtes hydrophiles non ioniques sont constituées de sucres (lactobionamide, galactose, glucose, mannose...), de polyol glycosylés ou non (tels que le Tris par exemple...) ou de polyéthylène glycol. Les dérivés de la lactobionamide 20 sont

15 synthétisés à partir du 4-cyano benzaldéhyde et de la lactobionolactone. Après protection de la fonction aldéhyde par acétalisation (15) puis réduction du groupement nitro, l'amine obtenue est condensée sur la lactobionolactone. L'acétylation des fonctions alcool et la déprotection de la fonction aldéhyde par l'acétaldéhyde en excès en milieu acide donne le synthon polaire 20.

20 Les autres têtes polaires sont synthétisées à partir du 4-carboxybenzaldéhyde. Les dérivés glucosylés (21), mannosylés (22), galactosylés (23), sont obtenus par condensation du Boc aminoéthanol sur les acétobromoglycosides correspondants (17, 18, 19) dans les conditions de la réaction d'Helferich. Après déprotection de la fonction amine et condensation sur la fonction acide, en présence d'un

25 agent de couplage peptidique on obtient les 3 têtes polaires glycosylées 21-23.

Le dérivé pegylé 24 est issu de la condensation d'un polyéthylène glycol fonctionnalisé par une amine sur la fonction acide du 4-carboxybenzaldéhyde protégé par un acétal. La déprotection de l'acétal permet l'obtention de ce dérivé. Enfin, il est possible d'obtenir un dérivé trigalactosylé 25 par condensation d'une amine déjà décrite dans la

30 littérature par Polidori A., Pucci B., Zarif L., Lacombe J-M., Riess J-G., Pavia A.A., *Chem. Phys. Lipids* (1995) 77, 225-251, sur la fonction acide du 4-carboxybenzaldéhyde.

d- Partie hydrophile ionique (Figure 4) :

La figure 4 illustre la préparation des composés de formule (II) dans laquelle :

X représente un groupement polaire ionique ;

5 Y représente $-\text{CH}_2-$ (composés 26, 27), $-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-(\text{CH}_2)_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-\text{CH}_2-$
 (composé 28), $-(\text{CH}_2)_2-\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-$ (composé 29) ;
 $y = 1$;
 $m = 1$.

10 Les têtes polaires ioniques sont constituées de groupements ammonium quaternaire, oxyde d'amine ou carnitine. Le groupement ammonium est synthétisé à partir du nitrile après réduction par AlLiH_4 et protection préalable de la fonction aldéhyde par l'éthylène glycol. L'amine obtenue est perméthylée par l'iodure de méthyle en présence de tributylamine dans le DMF, selon la méthode décrite par Sommer H.Z., Lipp H.I, Jackson L.L. *J. Org. Chem.* (1971) 36, 824-828.

15 Le produit cristallisé est hydrolysé dans l'acide acétique aqueux de manière à récupérer le dérivé 26.

20 L'oxyde d'amine 27 est obtenu à partir de la même amine après formation de l'amine tertiaire en présence de 2 équivalents d'iodure de méthyle. L'azote est oxydée par de l'eau oxygénée, 10 volumes dans le méthanol. Après déprotection de l'acétal on obtient le composé 27.

25 L'oxyde d'amine 29 est synthétisé par la méthode de McQuade et al. A partir du 4-carboxybenzaldéhyde protégé sur sa fonction aldéhyde par un groupement acétal et de la N-éthyl N', N'-diméthyl éthylène diamine. Cette méthode a été décrite par McQuade D.T., Quinn M.A., YU S.M., Polans A.S., Krebs M.P., Gellman S.H. *Angew. Chem. Int. Ed.* (2000) 39, 758-761.

Le couplage est réalisé en présence d'un agent de couplage peptidique, la DCC. Après oxydation de la fonction amine par l'eau oxygénée, 10 volumes et déprotection de l'acétal on récupère le composé 29.

30 Enfin, le dérivé 28 de la carnitine est obtenu par condensation de l'amine 15 sur l'anhydride succinique puis couplage de la fonction acide sur la fonction alcool de la carnitine dans le DMF en présence de DCC. Après déprotection de la fonction cétal, on obtient le produit 28.

e- Obtention des nitrones amphiphiles mono (Figure 5) et bicaténaires (Figure 6) :

Les différentes nitrones amphiphiles sont obtenues par couplage de la fonction aldéhyde des différents synthons polaires sur le groupement hydroxylamine des parties hydrophobes. En fonction de la nature plus ou moins polaire des têtes hydrophiles ioniques (très polaires), notées I, ou non ioniques glycosylées (apolaires car acétylées), notées NI, on utilisera un solvant polaire protique (éthanol) ou aprotique (THF). La réaction est cependant plus rapide dans les solvants polaires protiques (2 jours au lieu de 10 dans le THF).

Le rectangle portant l'indication -CH représente, dans ces figures, la chaîne hydrocarbonée éventuellement fluorée X'.

Le THF est utilisé avec des têtes polaires glycosylées car c'est un solvant qui ne provoque pas de réaction de desacétylation des fonctions alcool. Toutes les nitrones amphiphiles glycosylées ont été purifiées par CLHP en phase inverse (colonne C18/éluant méthanol-eau). Les composés ioniques ont été isolés par cristallisation. Les nitrones amphiphiles pegylées sont purifiées par chromatographie d'exclusion (sephadex LH20).

L'invention a en outre pour objet l'utilisation des composés répondant à la formule (I) telle que définie ci-dessus comme agent anti-radicaux libres.

En effet, il a été démontré que les composés selon la présente invention étaient dotés d'une capacité à piéger les radicaux libres équivalente à celle des composés de l'art antérieur.

Cette propriété permet d'envisager l'utilisation des molécules de l'invention dans des domaines variées :

- dans le domaine thérapeutique, les produits de l'invention peuvent être employés pour la prévention et/ou le traitement des pathologies liées au stress oxydatif et à la formation des espèces radicalaires oxygénées.

L'invention a par conséquent pour objet les compositions pharmaceutiques comprenant un composé selon l'invention dans un support pharmaceutiquement acceptable. Elle a pour objet l'utilisation d'un composé selon l'invention pour la préparation d'un médicament destiné à prévenir et/ou traiter les effets des radicaux libres.

Elle a également pour objet l'utilisation d'un composé de l'invention pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à prévenir et/ou traiter les pathologies liées au stress oxydatif et à la formation des espèces radicalaires oxygénées, notamment les maladies immunitaires et inflammatoires, le syndrome d'ischémie-reperfusion, l'athérosclérose, la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la maladie de Huntington, les lésions dues aux radiations UV et ionisantes, les cancers, le vieillissement cellulaire.

Les produits de l'invention peuvent être administrés par toute voie connue de l'homme du métier, notamment par injection intraveineuse ou intramusculaire, par administration orale ou cutanée. Ils peuvent être utilisés seuls ou en association avec d'autres actifs. Leur dosage et la quantité administrée quotidiennement sont adaptés en fonction de l'activité mesurée pour la molécule concernée et en fonction du poids du patient.

- dans le domaine cosmétique, les composés de l'invention peuvent être utilisés pour prévenir et/ou traiter les effets du vieillissement ainsi que les effets des radiations solaires.

L'invention a donc également pour objet une composition cosmétique comprenant un composé de l'invention dans un support cosmétiquement acceptable.

Ladite composition peut être destinée à une application sur la peau ou sur les phanères (ongles, cheveux).

Elle peut se présenter sous forme d'une solution aqueuse ou huileuse, d'une émulsion eau-dans-l'huile ou huile-dans-l'eau, d'une émulsion triple, d'un onguent.

Les composés de l'invention peuvent être introduits dans toute composition cosmétique pour laquelle une activité antiradicalaire est recherchée : une crème de soin cutanée, un produit de protection solaire, un démaquillant, un masque pour la peau ou les cheveux, un shampooing, un produit de maquillage tel qu'un rouge à lèvres, un fard, un fond de teint, un vernis à ongles, etc...

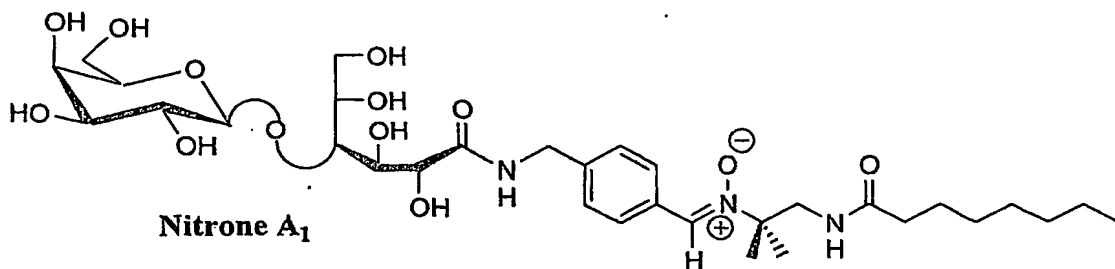
- dans le domaine de la synthèse organique, les composés de l'invention peuvent être utilisés comme capteurs de radicaux libres dans des réactions radicalaires.

Du fait de leur solubilité dans des milieux variés, les composés de l'invention sont faciles à mettre en œuvre et peuvent être employés dans des conditions très diverses.

PARTIE EXPERIMENTALE

I- Evaluation biologique :

Le composé A₁ a été utilisé pour mettre en œuvre des expériences de piégeage de radicaux libres. Plusieurs composés selon l'invention ont été testés *in vitro* pour leur capacité biologique antioxydante et antiradicalaire.



1- Mesure de la capacité de piégeage des espèces radicalaires

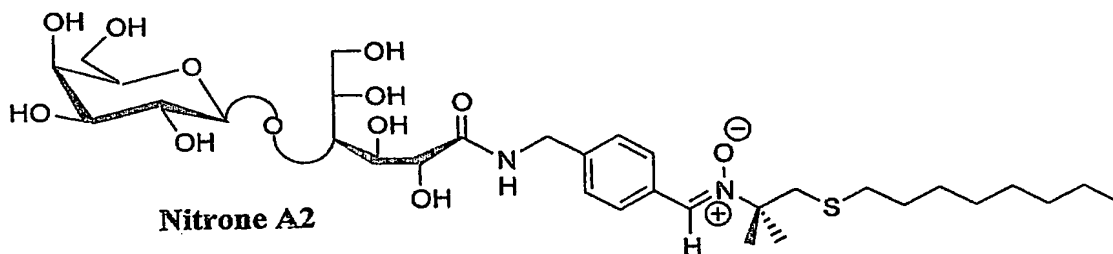
5 Les expériences de piégeage de radicaux libres centrés sur le carbone (radicaux CH_3 et CO_2) et sur l'oxygène (radical OH) réalisés sur le composé A_1 ont démontré que la fonctionnalisation de la PBN n'affectait pas la capacité de ces molécules à piéger les espèces radicalaires. Dans le cas des radicaux libres centrés sur le carbone des signaux RPE caractéristiques de ces espèces radicalaires ont pu être observés comme cela est illustré par la figure 7.

10 En revanche, lors de la génération de radicaux hydroxylés dans le système, des signaux RPE caractéristiques du piégeage de radicaux centrés sur le carbone sont détectés. Cela est dû au piégeage par la nitrone de radicaux carbonés produits sur les têtes polaires par réaction des radicaux $\cdot\text{OH}$ avec les hydrogènes des sucres.

15 2- Mesure *in vitro* de la capacité biologique antioxydante et antiracalaire

a- Evaluation de la capacité antiapoptotique sur neurones corticaux de rats par dosage de l'activité enzymatique de la caspase III.

20 Ces tests préliminaires ont été réalisés sur un dérivé nitrone amphiphile glycosylé hydrocarboné : la nitrone A_2 . Son activité anti apoptotique a été comparée à deux nitrones commerciales, la PBN et la DMPO.



25 Les cellules neuronales de rat ont été intoxiquées pendant 20 min par de l'eau oxygénée à $100\ \mu\text{M}$ au 8^{ème} jour de culture. Cette addition d'eau oxygénée crée un phénomène d'apoptose comme cela a été décrit par Whittemore E.R., Loo D.T., Cotman C.W. *Neuroreport* (1994) 5, 1485-1488 (vérifié par un contrôle positif d'apoptose par addition de staurosporine) évalué par dosage colorimétrique à 405 nm d'une enzyme spécifique de ce métabolisme, la caspase III par rapport à un témoin d'intoxication maximale (précédemment décrit par Nicholson D.W., Ali A., Thornbury N.A.,

30 Vaillancourt J.P., Ding C.H., Gallant M., Griffin P.R., Labelle M., Lazebnik Y.A., Munday

N.A., Raju S.M., Smulson M.E., Yannin T., Yu V.I., Miller D.K. *Nature* (1995) 376, 37-43.)

Les différentes molécules à tester ont été incubées pendant 20 heures à des concentrations variables non toxiques (10, 100, 200 μM) avant intoxication par l'eau oxygénée. Après rinçage et séchage à l'étuve les cellules sont lysées avant dosage colorimétrique. La nitrone amphiphile A_2 possède une cytotoxicité significative à partir de 400 μM .

Les résultats obtenus (illustrés par la figure 8) montrent clairement une très nette diminution de l'activité caspase III après intoxication à l'eau oxygénée 100 μM en présence de la nitrone amphiphile A_2 . Cette activité se révèle beaucoup plus faible que l'activité normale de la caspase III sur des cellules neuronales non intoxiquées. Les résultats indiquent clairement un niveau de protection supérieur à celui mesuré pour les nitrones commerciales PBN et DMPO.

15 **b- Evaluation de l'efficacité neuroprotectrice sur cocultures nerf-muscle**

L'évaluation protectrice de ces nitrones amphiphiles a été mesurée sur des cocultures nerfs-muscles après intoxication 30 min à l'eau oxygénée.

Les cellules musculaires humaines issues de prélèvements de muscles striés sains sont isolées par migration de cellules satellites dans un milieu de culture approprié. Ces cellules vont fusionner en myofibres non contractiles dans le milieu de culture. Des explants de moelle épinière d'embryon de rat sont déposés sur les cellules musculaires.

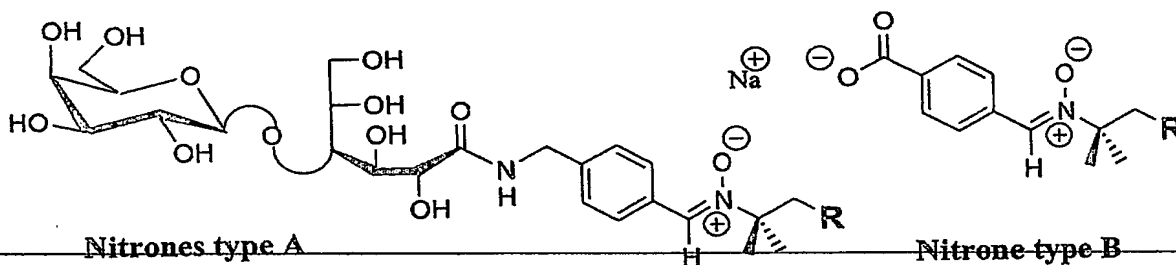
Après trois semaines, toutes les fibres musculaires au voisinage des explants se contractent et possèdent des jonctions neuromusculaires matures. Après maturation, ces cultures sont sélectionnées et filmées avec une caméra vidéo couplée à un microscope. Les molécules de type A (A_1 , A_2 , A_3 , A_4) et B (B_1) sont incubées pendant 20h00 aux concentrations de 100 et 200 μM . Les cellules sont ensuite intoxiquées pendant 30 min avec H_2O_2 800 mM puis rincées. 24h00 et 48h00 après avoir généré ce stress oxydatif, les cellules sont observées et filmées.

Après 20h00 d'incubation il s'avère que le composé B_1 ionique de type carboxylate est cytotoxique et provoque une dégradation rapide des cellules musculaires. Les autres composés ne sont pas toxiques mais provoquent un arrêt ou un ralentissement des contractions musculaires quelque soit la contraction utilisée (100 et 200 μM). En revanche, on observe une récupération totale ou partielle des contractions 48h00 après intoxication par l'eau oxygénée pour les composés perfluorés A_3 et A_4 à la concentration de 100 μM et hydrocarbonés A_1 et A_2 à 100 et 200 μM (tableau 1). Les autres composés

protègent les cellules de la dégradation mais ne permettent pas la récupération des contractions.

La quantification de l'état d'apoptose a ensuite été réalisée après lyse des cellules et centrifugation en dosant la quantité d'ADN fragmentée par un kit « cell death detection ELISA » dans les surnageants. Après révélation enzymatique, les densités optiques sont mesurées à 405 nm par un lecteur de plaque (figure 9).

Les résultats indiquent clairement que toutes les molécules testées, à l'exclusion du dérivé ionique B1, protègent les cellules de l'apoptose induite par l'addition d'eau oxygénée. A une concentration de 200 mM, le dérivé carboxylate B1 présente un signal d'apoptose très faible artefactuel qui est du avant la lyse cellulaire à une libération des fragments d'ADN dans le milieu de culture après la mort des cellules en culture traitées par cette nitrone.



Nitrones	R	[C] μM	Activité contractile des fibres musculaires(nombres de puits)				% d'inactivité contractile
			0	+	++	+++	
A ₁	C ₇ H ₁₅ CONH	100			2		0
		200		3			0
A ₂	C ₈ H ₁₇ S	100	3				100
		200	2				100
A ₃	C ₆ F ₁₃ CH ₂ CH ₂ S	100				3	0
		200	1	1		1	33.3
A ₄	C ₆ F ₁₃ CH ₂ CH ₂ CONH	100	1	2			33.3
		200	3				100
B ₁	C ₈ H ₁₇ S	100	mc ¹				100
		200	mc				100
PBN		200	mc				100
DMPO		200	mc				100
Témoin					1	1	0
Témoin H ₂ O ₂				3	1		75

¹ mort cellulaire

Tableau 1 : Mesure de l'activité contractile de cultures cellulaires nerf-muscle 48h00 après intoxication par H₂O₂ 800 μM

5

0	Pas de fibres musculaires ayant une activité contractile dans le puits de culture
0/+	Une fibre musculaire ayant une activité contractile faible et irrégulière
+	Une fibre musculaire ayant une activité contractile régulière
++	2 à 4 fibres musculaires ayant une activité contractile
+++	Plus de 4 fibres musculaires ayant une activité contractile

10

Tableau 2 : Critère d'observation de l'activité contractile des fibres musculaires

c. Evaluation de l'activité antioxydante sur des lignées cellulaires de fibroblastes souffrant d'un sévère déficit du complexe V de la chaîne respiratoire : détermination de la viabilité cellulaire par le test MTT

5 Les tests sont réalisés sur des lignées cellulaires de fibroblastes caractérisées par une mutation du gène NARP codant pour une protéine (sous-unité 6) du complexe V de la chaîne mitochondriale. Ces cellules sont caractérisées par une surproduction anormale de l'enzyme superoxyde dismutase suggérant que ce déficit génétique provoque un accroissement de la production de radical superoxyde. Cette
10 surproduction de radical superoxyde provoque un processus d'apoptose accéléré des cellules (Geromel V., Kadhon N., Cebalos-Picot I., Ouari O., Polidori A., Munnich A., Rötig A., Rustin P. *Hum. Mol. Genet.* (2001) 10, 1221-1228).

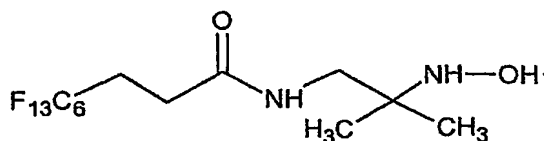
Des cultures de fibroblastes ont été préparées à partir d'une biopsie de peau de deux individus (contrôle) et d'un patient porteur de la mutation NARP. Les cellules
15 ont été cultivées dans un milieu RPMi 1640 (commercialisé par Life technologies SARL, Cergy Pontoise, France) additionné de glutamax (446 mg/l), 10% sérum fœtal de veau non dialysé, 100 µg/ml streptomycine, 100 IU/ml pénicilline, 200 µM uridine, 2.5 mM pyruvate de sodium. Pour les tests de cytotoxicité les cellules ont étéensemencées à une densité de 3000 cellules par puits dans des microboîtes de Petri à 37°C sous 5% de CO₂.

20 Pour initier le stress oxydatif, la cellule est soumise après 24 heures à une hypoglycémie par remplacement du glucose par du galactose à 10 mM (milieu sélectif noté ms dans les figures 10a à 10f). Après 24 heures les cellules ont été exposées pendant 48 heures et 72 heures à des concentrations croissantes des différents composés à tester en milieu sélectif destiné aux cellules respiratoires (milieu RPMi 1640 sans glucose). Aux fins de
25 comparaison, toutes les études ont été faites sur des cellules recueillies après un même doublement de population..

L'activité antioxydante des nitrones amphiphiles a été évaluée en mesurant leur capacité à protéger les cellules contre l'apoptose avec le test MTT.

Le test MTT est une méthode colorimétrique qui permet de déterminer le
30 nombre de cellules viables en essais de prolifération et de cytotoxicité. Les puits ont été mis à incuber avec 20 µl d'une solution de MTT (5 mg/ml dans du PBS) pendant 1 heure à 37°C. Puis, 200 µl d'isopropanol ont été ajoutés pour extraire le MTT formazan et l'absorbance de chaque puit a été mesuré à 540 nm à l'aide d'un appareil de lecture automatique.

35 Les résultats obtenus avec les essais colorimétriques MTT sont illustrés par les figures 10a à 10 f. Dans ces figures le composé A₅ est un nitrone de type A dans lequel R=OCONH(CH₂)₅CH₃ et le composé H répond à la formule ci-dessous :



Composé H

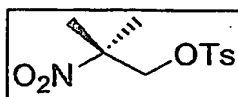
Ce test démontre la capacité de protection de la TA1PBN dès la concentration de 50 μM à protéger les cellules NARP de la mort cellulaire par apoptose. Ces résultats confirment donc bien les analyses précédemment effectuées sur la TA1PBN (Geromel V., Kadhom N., Cebalos-Picot I., Ouari O., Polidori A., Munnich A., Rötig A., Rustin P. *Hum. Mol. Genet.* (2001) 10, 1221-1228). Le composé **B**₁ perfluorocarboné semble également être efficace à partir d'une concentration de 100 μM . Il est à noter que le composé perfluorocarboné **A**₄ et les composés hydrocarbonés **A**₁, **A**₂ et **A**₅ ne sont pas efficaces sur ce modèle cellulaire. On peut imputer ce défaut d'efficacité à un manque d'hydrophobie des chaînes grasses hydrocarbonées. Le composé perfluoré **A**₄ possède une longueur de chaîne inférieure à celle du composé **A**₃. Il est à noter enfin que la TA1PBN présente une chaîne perfluorée en C_8F_{17} plus longue que celle du composé **A**₃ (chaîne en C_6F_{13}). Ceci peut expliquer la différence d'efficacité dans le traitement des cellules NARP par ces deux nitrones amphiphiles. Des tests sont en cours sur des dérivés analogues à **A**₃ possédant une chaîne fluorée en C_8F_{17} . En conclusion il semble que le degré d'hydrophobie de ces nitrones semble jouer un rôle crucial sur leur activité biologique. Elle doit probablement être conditionnée par la capacité de transfert de la nitrone à travers la membrane cytoplasmique et peut-être dans la cavité mitochondriale.

II- exemples de synthèses

1. Synthèse d'une nitrone amphiphile monocaténaire hydrocarbonée glycosylée

a. Synthèse du 4-méthyl benzène sulfonate de 2-méthyl-2-nitropropyle

E3



9.6 g de chlorure de tosylo (0.050 mol - 1.2 équiv.) sont dissous dans 30 mL de pyridine. 5 g de 2-méthyl-2-nitropropanol (0.042 mol - 1 équiv.) en solution dans 30 mL de dichlorométhane sont ensuite ajouté goutte à goutte. Le milieu est maintenu à 0°C pendant l'addition puis à température ambiante pendant 48 heures. Le mélange réactionnel est jeté dans 150 mL d'eau glacée sous forte agitation. La phase aqueuse est

extraite par 3 fois 50 mL de dichlorométhane. Les phases organiques sont réunies, lavées par 3 fois 75 mL d'HCl 3N puis par 2 fois 75 mL de saumure, séchée sur Na₂SO₄ enfin évaporées sous pression réduite. Après recristallisation dans un mélange acétate d'éthyle/cyclohexane, le composé **E3** est obtenu sous forme d'une poudre blanche légère
 5 (9.55 g - 0.035 mol - 83 %). Ratio front : 0.35 (cyclohexane/acétate d'éthyle 8:2). Pf = 74-75.5°C

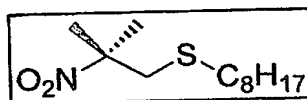
RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃) : δ 7.76 (2H, d, J = 8.5 Hz, H arom.), 7.37 (2H, d, J = 8.5 Hz, H arom.), 4.27 (2H, s, CH₂-O), 2.46 (3H, s, CH₃ du tosylo), 1.56 (6H, s, CH₃ du *tert*-butyl)

10 RMN ¹³C (62.86 MHz, CDCl₃) : δ 146.1 (C^{IV}-arom.), 132.6 (C^{IV}-arom.), 130.7 et 128.6 (CH arom.), 86.3 (C^{IV}), 73.2 (CH₂-O), 23.5 (CH₃ du *tert*-butyl), 22.3 (CH₃ du tosylo)

Infra-rouge (KBr, cm⁻¹) : ν (CH arom.) = 3059 et 3005, ν (NO₂) = 1543

b. Synthèse du 1-octanesulfanyl-2-méthyl-2-nitropropyle **E7a**

15

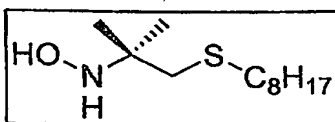


Sous atmosphère d'argon, 4.1 g de *tert*-butylate de potassium (0.039 mol
 20 - 2 équiv.) sont mis en suspension dans 30 mL de DMF anhydre. Après 20 minutes d'agitation, 6.4 mL d'octanethiol (0.039 mol - 2 équiv.) en solution dans 10 mL de DMF sont additionnés goutte à goutte par l'ampoule à brome. Le milieu prend progressivement un aspect blanc laiteux et après 10 minutes, 5 g de **E3** (0.0183 mol - 1 équiv.) dissous dans 20 mL de DMF sont ajoutés lentement. Le milieu réactionnel est porté à 50°C sous flux
 25 d'argon pendant 4 heures. Le mélange est jeté dans 400 mL de saumure glacée puis extrait par 5 fois 50 mL de cyclohexane. La phase organique est lavée par 2 fois 100 mL de saumure, séchée sur Na₂SO₄ et évaporée sous pression réduite. Après purification par flash chromatographie sur gel de silice (éluant: cyclohexane/dichlorométhane 9:1 à 8:2), le composé **E7a** (4.4 g - 0.0178 mol - 97 %) est obtenu sous forme d'une huile. Rf : 0.65
 30 (cyclohexane/acétate d'éthyle 8:2)

RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃) : δ 3.04 (2H, s, C^{IV}-CH₂-S), 2.52 (2H, t, J = 7.25 Hz, CH₂-S), 1.64 (6H, s, CH₃ du *tert*-butyl), 1.54 (2H, qt, J = 7.25 Hz, CH₂-CH₂-S), 1.40 à 1.20 (10H, m, CH₂ de la chaîne), 0.87 (3H, t, J = 7 Hz, CH₃ de la chaîne).

35 RMN ¹³C (62.86 MHz, CDCl₃) : δ 87.4 (C^{IV}), 41.5 (C^{IV}-CH₂), 33.2 (CH₂-S), 30.8, 28.8, 28.1 et 27.7 (CH₂ de la chaîne), 24.4 (CH₃ du *tert*-butyl), 21.6 (CH₂ de la chaîne), 13.1 (CH₃ de la chaîne).

Infra-rouge (KBr, cm⁻¹) : ν (NO₂) = 1543

c. Synthèse de la N-(1,1-Diméthyl-2-octylsulfanyl-ethyl)-hydroxylamineE7b

5

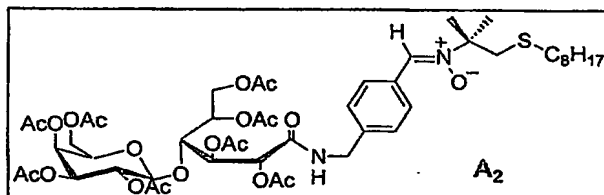
0.247 g de composé nitro E7a (1 mmol - 0.25 équiv) est dissous dans 6 mL d'un mélange THF/MeOH (2 : 1) préalablement dégazé à l'argon. Cette solution est ajoutée en une fois sur le réactif de Kagan (4 équiv.) sous atmosphère inerte. La réaction, quasi instantanée, est suivie par apparition d'une coloration vert gris (disparition de l'espèce SmI_2 au profit de l'espèce SmI_3). Après 15 minutes d'agitation, 20 mL d'une solution de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ à 10 % est additionné au milieu réactionnel. Le THF est évaporé sous pression réduite. La phase aqueuse est diluée 2 fois puis extraite par 3 fois 30 mL d'acétate d'éthyle. la phase organique est lavée par 2 fois 30 mL d'eau distillé puis évaporée sous pression réduite. La purification par chromatographie sur gel de silice (éluant: cyclohexane/acétate d'éthyle 8:2 à 7:3) conduit à l'hydroxylamine E7b (164 mg - 0.7 mmol - 70%) sous forme d'une huile translucide.

50 mg du composé E7a de départ sont également recueillis et permettent de déterminer un taux de conversion de 88 %.

RMN ^1H (250 MHz, DMSO) : δ 7.09 (1H, s, NH), 5.3 (1H, bs, OH), 2.63 (2H, s, $\text{C}^{\text{IV}}\text{-CH}_2\text{-S}$), 2.55 (2H, t, $J = 7.2$ Hz, $\text{CH}_2\text{-S}$), 1.64 (6H, s, CH_3 du *tert*-butyl), 1.54 (2H, qt, $J = 6.7$ Hz et $J = 7.2$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-S}$), 1.40 à 1.20 (10H, m, CH_2 de la chaîne), 0.87 (3H, t, $J = 7$ Hz, CH_3 de la chaîne)

RMN ^{13}C (62.86 MHz, CDCl_3) : δ 57.2 (C^{IV}), 40.8 ($\text{C}^{\text{IV}}\text{-CH}_2$), 33.2 ($\text{CH}_2\text{-S}$), 31.2, 29.4, 28.6 et 28.5 (CH_2 de la chaîne), 23.7 (CH_3 du *tert*-butyl), 22.0 (CH_2 de la chaîne), 13.9 (CH_3 de la chaîne)

Infra-rouge (KBr, cm^{-1}) : $\nu_{\text{(NH)}}$ = 3246

d. Synthèse de la nitrone hydrocarbonée A2

30

0.5 g d'aldéhyde glycosylé (Ouari O., Chalier F., Pucci B., Tordo P., *J. Chem. Soc., Perkin Trans 2* (1998), 2299) (0.615 mmol - 1 équiv.) sont mis en solution sous atmosphère d'argon dans 10 mL de THF anhydre et dégazé. 0.1 g d'hydroxylamine

35

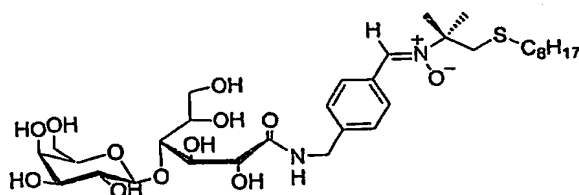
E7b (0.430 mmol – 0.7 équiv) en solution dans 2 mL de THF sont additionnées ainsi qu'une pointe de spatule de tamis 4 Å. Le mélange réactionnel est porté à 60 °C sous argon et à l'abri de la lumière. Tous les deux jours, 50 mg d'hydroxylamine (0.215 mmol – 0.35 équiv.) et une pointe de spatule de tamis 4 Å sont additionnés. L'avancement de la réaction est apprécié par CCM et après 8 jours et ajout de 1.75 équiv d'hydroxylamine le milieu réactionnel est filtré sur célite. Après évaporation sous pression réduite des solvants, le brut réactionnel est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (éluant : acétate d'éthyle/cyclohexane 7:3). Une purification supplémentaire est effectuée sur résine d'exclusion LH-20 (éluant : Méthanol/Dichlorométhane 1:1) et conduit à la nitrone A2 (313 mg – 0.304 mmol – 50 %) pure et à 116 mg d'une fraction comportant de l'aldéhyde de départ (dans un rapport 1/3 environ déterminé par RMN ¹H). Pf = 70°C (dec). [α]_D = + 17.8 ° (c, 1, CH₂Cl₂).

RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃) : δ 8.24 (2H, d, J = 8.1 Hz), 7.49 (1H, s, CH=N(O)), 7.25 (2H, d, J = 8.1 Hz), 6.57 (1H, m, NH), 5.67 (1H, d, J = 6.6 Hz, H-2), 5.60 (1H, dd, J = 3.8 Hz et J = 5.8 Hz, H-3), 5.37 (1H, d, J = 3 Hz, H-4'), 5.18 (1H, dd, J = 2.5 Hz et J = 10.3 Hz, H-2'), 5.08 (1H, m, H-5), 4.98 (1H, dd, J = 3.4 Hz et J = 10.4 Hz, H-3'), 4.65 (1H, d, J = 7.9 Hz, H-1'), 4.62 à 4.45 (2H, m, 1 H-6a et H-7a), 4.42 à 4.30 (2H, m, H-4 et H-7b), 4.23 à 3.98 (3H, m, H-6b, H-6'a et H-6'b), 3.90 (1H, t, J = 6.5 Hz), 3.00 (2H, s, C^{IV}-CH₂-S), 2.41 (2H, t, J = 7.25 Hz, CH₂-S), 2.13, 2.05, 2.02, 2.01, 1.98, 1.95 (24H, 6s, CH₃-CO), 1.61 (6H, s, CH₃ du *tert*-Butyl), 1.43 (2H, m, CH₂-CH₂-S), 1.3 à 1.1 (10H, m, CH₂ de la chaîne), 0.82 (3H, t, J = 6.6 Hz, CH₃ de la chaîne).

RMN ¹³C (62.86 MHz, CDCl₃) : δ 170.4, 170.4, 170.0, 170.0, 169.9, 169.7, 169.7, 169.5, 169.2 (CH₃-CO), 167.1 (CO-NH), 139.8 (C^{IV} arom.), 131.0 (CH=N(O)), 130.1 (C^{IV} arom.), 129.2, 127.5 (CH arom.), 101.7 (CH-1'), 77.3 (CH-4), 73.4 (C^{IV}), 71.7 (CH-2), 70.9 (CH-5' et CH-3'), 69.7 (CH-5), 69.1 (CH-3), 68.9 (CH-2), 66.8 (CH-4'), 61.6, 60.9 (CH₂-OAc), 42.9 CH₂-NH), 42.4 (C^{IV}-CH₂-S), 33.3 (CH₂-S), 31.7, 29.9, 29.0, 29.0, 28.6 (CH₂ de la chaîne), 25.7 (CH₃ du *tert*-butyl), 22.5 (CH₂ de la chaîne), 20.8, 20.7, 20.6, 20.6, 20.6, 20.5, 20.5, 20.4 (CH₃-CO), 14.0 (CH₃ de la chaîne).

MS FAB+ (1027.1 g.mol⁻¹) : [M+H]⁺ = 1027 (5%), [M+Na]⁺ = 1049 (10%), [C₁₂H₂₅S]⁺ = 201 (70%).

Après désacétylation des sucres par le méthode de Zemplen on obtient le produit déprotégé :



Pf = 115°C (dec)

Rf : 0.52 (acétate d'éthyle/méthanol/eau 7:2:1)

$[\alpha]_D = +17.2$ (0.25c, 1, CH₃OH)

RMN ¹H (250 MHz, CD₃OD) : δ 8.28 (2H, d, J = 8.25 Hz), 7.82 (1H, s, CH=N(O)), 7.42 (2H, d, J = 8.25 Hz), 4.65 à 4.35 (4H, m, CH₂-NH, H-1', H-2), 4.25 (1H, m, H-3), 4.00 à 3.35 (10H, m, H-4, H-5, CH₂-OH, H-4', H-5', H-3' et H-2'), 3.01 (2H, s, CH₂-S), 2.43 (2H, t, J = 7.3 Hz, CH₂-S), 1.61 (6H, singulet, CH₃ du *tert*-butyl), 1.44 (2H, m, CH₂), 1.3 à 1.1 (10H, m, CH₂), 0.87 (3H, t, J = 6.9 Hz)

RMN ¹³C (62.86 MHz, CD₃OD) : δ 175.3 (CO-NH), 143.4 (C^{IV} arom.), 136.0 (CH=N(O)), 131.1 (CH arom.), 130.6 (C^{IV} arom.), 128.3 (CH arom.), 105.8 (CH-1'), 83.3 (CH-4), 77.2 (CH-5'), 74.8 (C^{IV}), 74.6 (CH-3' ou CH-2'), 74.1 (CH-2), 73.2 (CH-5), 72.8 (CH-3' ou CH-2'), 72.5 (CH-3), 70.4 (CH-4'), 63.8, 62.7 (CH₂-OH), 43.5, 43.0 (CH₂-NH et CH₂-S), 34.2 (CH₂-S), 32.9, 31.0, 30.3, 30.2, 29.7 (CH₂), 26.0 (CH₃ du *tert*-butyl), 23.7 (CH₂), 14.4 (CH₃)

UV (MeOH, nm) : $\lambda_{\max} = 299$

MS FAB⁺ (690.8 g.mol⁻¹) : Pas de [M+H]⁺, [M+Na]⁺ = 713 (2.5%), [M+K]⁺ = 729 (1.5%), [C₁₂H₂₅S]⁺ = 201 (65%)

MS FAB⁻ (690.8 g.mol⁻¹) : [M-H]⁻ = 689 (très faible)

HPLC (Microsorb C18 – 21.4 mm / 250 mm) : tr = 11.4 min

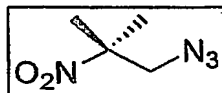
Gradient 70 MeOH - 30 H₂O à 85 MeOH - 15 H₂O de t = 0 à t = 5 min

Isocratique 85 MeOH - 15 H₂O à partir de t = 5 min

Débit 0.6 mL/min

2. Synthèse de la nitrone fluorocarbonée A₄

a. Synthèse du 1-azido-2-méthyl-2-nitropropane



6 g du composé E3 (0.0218 mol - 1 équiv.) et 2.3 g d'azoture de sodium (0.0353 mol - 1.6 équiv.) sont mis en réaction dans 20 mL de DMF sous activation ultrasonique (grosse sonde – pulse 1 sec/repos 2 sec – amplitude 90 %) en refroidissant le milieu par un bain de glace. Après 3 heures de sonication et disparition complète du produit de départ le milieu réactionnel est repris dans 50 ml de dichlorométhane puis jeté sous vive agitation sur 300 mL de saumure glacée. La phase aqueuse est extraite par 2 fois 50 mL de dichlorométhane puis les phases organiques sont réunies, lavées par 2 fois 75 mL de saumure, séchées sur Na₂SO₄ et évaporées sous pression réduite. Après élimination à 50

°C sous vide de la pompe à palette des traces résiduelles de DMF, le composé final (2.66 g - 0.0185 mol - 85 %) est obtenu sous forme d'une huile jaune translucide très liquide.

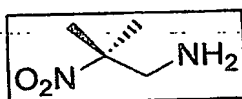
RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3) : δ 3.74 (2H, s, $\text{CH}_2\text{-N}_3$), 1.60 (6H, s, CH_3 du *tert*-butyl)

5 RMN ^{13}C (62.86 MHz, CDCl_3) : δ 86.7 (C^{IV}), 58.3 ($\text{CH}_2\text{-N}_3$), 23.9 (CH_3 du *tert*-butyl)

Infra-rouge (KBr, cm^{-1}) : ν (N_3) = 2111, ν (NO_2) = 1546

b. Synthèse de la 2-méthyl-2-nitro-propylamine E4

10



4.08 g d'azoture (0.0283 mol - 1 équiv.) sont mis en solution sous flux d'azote dans 10 mL de THF anhydre et dégazé. 11.3 g de triphénylphosphine (0.0431 mol - 1.50 équiv.) en solution dans 30 mL de THF sont additionnés goutte à goutte à l'azido. Un fort dégagement gazeux se produit. Après 2 heures d'agitation à température ambiante sous atmosphère d'azote, 20 mL d'une solution aqueuse de soude 2N sont ajoutés et le milieu est abandonné 24 heures. Le THF est évaporé sous pression réduite, la phase aqueuse acidifiée jusqu'à pH 1 par addition de 20 mL d'HCl 3N, puis est extraite par 2 fois 30 mL

15 d'acétate d'éthyle. La phase aqueuse est ensuite basifiée par ajout de soude solide jusqu'à pH 10 puis extraite par 3 fois 30 mL de dichlorométhane. La phase organique est lavée par 2 fois 30 mL d'eau, séchée sur Na_2SO_4 et évaporée sous pression réduite. L'amine E4 (2.90 g - 0.0245 mol - 87 %) est obtenue sous forme d'huile jaune.

20 RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3) : δ 3.07 (2H, s, $\text{CH}_2\text{-NH}_2$), 1.57 (6H, s, CH_3 du *tert*-butyl)

25 RMN ^{13}C (62.86 MHz, CDCl_3) : δ 89.4 (C^{IV}), 51.1 ($\text{CH}_2\text{-NH}_2$), 23.6 (CH_3 du *tert*-butyl)

Compte tenu de son instabilité, pour sa caractérisation et sa conservation nous avons synthétisé le chlorhydrate d'ammonium correspondant :

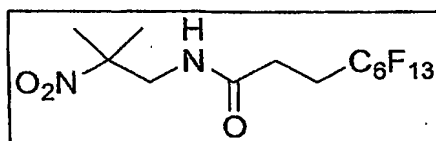
30 L'amine est reprise dans 60 mL d'éther dans lequel on fait buller de l'HCl gazeux pendant 10 minutes. Le milieu est placé 2 heures à -20°C puis filtré sous pression réduite. Après élimination des traces de solvant à la pompe à palette, le chlorhydrate d'ammonium de E4 (3.75 g - 0.0243 mol - rendement quantitatif) est obtenu sous forme d'une poudre blanche.

35 RMN ^1H (250 MHz, D_2O) : δ 3.62 (2H, s, $\text{CH}_2\text{-NH}_3^+\text{Cl}^-$), 1.72 (6H, s, CH_3 du *tert*-butyl)

RMN ^{13}C (62.86 MHz, D_2O) : δ 87.0 (C^{IV}), 46.9 ($\text{CH}_2\text{-NH}_3^+\text{Cl}^-$), 24.8 (CH_3 du *tert*-butyl)

Infra-rouge (KBr, cm^{-1}) : $\nu_{(\text{NO}_2)} = 1541$

5 c. Synthèse du 4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-Tridecafluorononanoyl (2-methyl-2-nitropropyl) amide **E5a**



10 Sous atmosphère d'azote, 2.47 g de DCC (0.0120 mol - 1.2 équiv.) et une pointe de spatule d'HOBt sont mis en solution dans 10 ml de dichlorométhane anhydre. 1.41 g de l'amine **E4** (0.012 mol - 1.2 équiv.) en solution dans 10 mL de dichlorométhane sont ajoutés au milieu. La solution est dégazée pendant quelques minutes, puis 3.86 g d'acide fluoré (0.0098 mol - 1 équiv.) en solution dans 30 mL d'acétate d'éthyle sont additionnés en une seule fois. Après 36 heures d'agitation le milieu réactionnel est filtré, la phase organique est lavée respectivement par 2 fois 50 mL d'HCl 1N, 2 fois 50 mL de saumure puis séchée sur Na_2SO_4 et évaporée sous pression réduite. La purification par chromatographie sur gel de silice (éluant: cyclohexane/acétate d'éthyle 8:2 à 7:3) conduit au composé **E5a** (4.4 g - 8.94 mmol - 91%) sous forme d'une poudre blanche. Pf = 87,3-88,8 °C. Rf : 0.37 (cyclohexane/acétate d'éthyle 8:2).

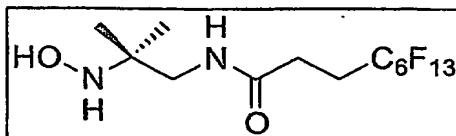
RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3) : δ 6.11 (1H, massif, NH), 3.76 (2H, d, $\text{C}^{\text{IV}}\text{-CH}_2\text{-NH}$, $J = 6.75$ Hz), 2.55 à 2.42 (4H, massif, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-Rf}$), 1.58 (6H, massif, CH_3 du *tert*-butyl)

RMN ^{13}C (62.86 MHz, CDCl_3) : δ 170.5 (CO), 88.7 (C^{IV}), 46.1 ($\text{CH}_2\text{-NH-}$), 24.1 (CH_3 du *tert*-butyl)

RMN ^{19}F (235 MHz, CDCl_3) : δ -81.1 (CF_3 , singulet), -114.8 ($\text{CF}_2\text{-CH}_2$, singulet), -122.1, -123.1, et -123.8 (CF_2 , singulet), -126.4 ($\text{CF}_2\text{-CF}_3$)

Infra-rouge (KBr, cm^{-1}) : $\nu_{(\text{NH})} = 3280$, $\nu_{(\text{C-O})} = 1664$, $\nu_{(\text{NO}_2)} = 1547$, $\nu_{(\text{CF}_2)} = 1246$

30 d. 4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-Tridecafluorononanoyl (2-hydroxyamino-2-methylpropyl) amide **E5b**



La procédure expérimentale est identique à celle utilisée pour la première hydroxylamine E7b. 1.71 g de composé nitro E7a (3.5 mmol - 0.25 équiv) en solution dans 21 mL de mélange THF/MeOH, sont additionnés à 140 mL du réactif de Kagan.

Après traitement et purification par chromatographie sur gel de silice (éluant: acétate d'éthyle/méthanol 10:0 à 9.5:0.5), l'hydroxylamine E7b (0.82 g - 1.7 mmol - 49 %) est obtenue sous forme d'une poudre blanche.

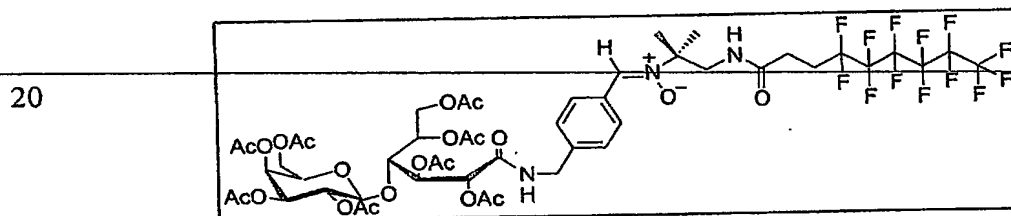
0.56 g du composé E7a de départ sont également recueillis et permettent de déterminer un taux de conversion de 72 %. Pf = 110.5-112.3 °C. Rf: 0.58 (acétate d'éthyle/méthanol 95:5).

10 RMN ¹H (250 MHz, DMSO) : δ 7.79 (1H, t, J = 6.0 Hz, NH), 6.89 (1H, s, NH), 5.23 (1H, bs, OH), 3.05 (2H, d, J = 6.0 Hz, CH₂-NH), 2.48 (4H, m, CH₂-CH₂-Rf), 0.86 (6H, s, CH₃ du *tert*-butyl)

RMN ¹³C (62.86 MHz, DMSO) : δ 169.7 (CO), 56.9 (C^{IV}), 44.7 (C^{IV}-CH₂); 22.4 (2 CH₃ du *tert*-butyl)

15 RMN ¹⁹F (235 MHz, DMSO) : δ -80.0 (CF₃, singulet), -113.4 (CF₂-CH₂, singulet), -121.5, -122.5 et -123.0 (CF₂, singulet), -125.6 (CF₂-CF₃, singulet)

e. Synthèse de la nitrone fluorocarbonée A4



La procédure expérimentale est identique à celle utilisée pour la première nitron.

25 0.61 g d'aldéhyde (0.75 mmol - 1 équiv.) sont mis en réaction avec l'hydroxylamine E7b (0.26g - 0.7 équiv.) dans 15 mL de THF. Après 10 jours d'agitation et addition de 0.35 g supplémentaire d'hydroxylamine (0.732 mmol - 0.98 équiv.) la réaction est stoppée.

30 Les purifications sont effectuées par chromatographie flash sur gel de silice (éluant : Acétate d'éthyle/Méthanol 10:0 à 95:5) et par chromatographie d'exclusion sur résine LH-20 (éluant : Méthanol/Dichlorométhane 1:1). La nitron A₄ est obtenue pure (0.564 g - 0.443 mmol - 60 %) sous forme d'une mousse blanche. L'aldéhyde de départ (115 mg - 0.142 mmol) est également récupéré ce qui permet de déterminer un taux de conversion de 73 %. Pf = 95 °C (dec)

35 RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃) : δ 8.21 (2H, d, J = 8.1 Hz), 7.49 (1H, s, CH=N(O)), 7.31 (2H, d, J = 8.1 Hz), 6.95 (1H, t, J = 6 Hz, NH), 6.76 (1H, t, J = 6 Hz, NH), 5.45 à 3.80 (15H), 3.69 (2H, d, J = 6.0 Hz, C^{IV}-CH₂-NH), 2.70 à 2.35 (4H, m, CH₂-

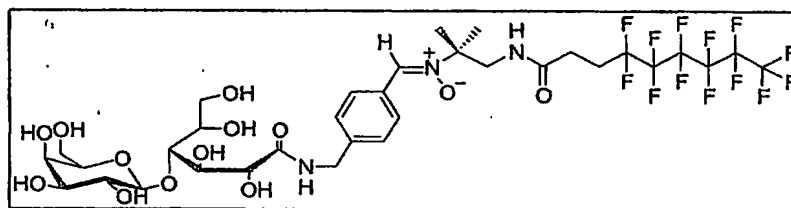
CH₂-Rf), 2.17, 2.16, 2.08, 2.07, 2.06, 2.05, 2.04, 1.98 (24H, 8s, CH₃-CO), 1.60 (6H, s, CH₃ du *tert*-Butyl)

RMN ¹³C (62.86 MHz, CDCl₃) : δ 170.6 (CO-NH + CH₃-C=O), 170.4, 170.2, 170.1, 170.0 169.8, 169.7, 169.3 (CH₃-C=O), 167.3 (CO-NH), 140.6 (C^{IV} arom.), 131.5 (CH=N(O)), 129.8 (C^{IV} arom.), 129.4, 127.7 (CH arom.), 101.9 (CH-1'), 77.5 (CH-4), 73.4 (C^{IV}), 71.7 (CH-2), 71.0 (CH-5' et CH-3'), 70.0 (CH-5), 69.3 (CH-3), 69.1 (CH-2), 66.9 (CH-4'), 61.8, 60.9 (CH₂-OAc), 47.3, 43.1 (CH₂-NH), 27.0 (), 24.9 (CH₃ du *tert*-butyl), 20.9, 20.8, 20.7, 20.7, 20.6, 20.5 (CH₃-CO)

RMN ¹⁹F (235 MHz, CDCl₃) : δ -81.1 (CF₃, s), -115.0 (CF₂-CH₂, s), -122.3, -123.2, -123.9 (CF₂, s), -126.5 (CF₂-CF₃, s)

MS FAB⁺ (1272.0 g.mol⁻¹) : [M+H] = 1273 (1.5%), [M+Na] = 1295 (3.5%)

Après désacétylation des sucres par la méthode de Zemplen on obtient le produit déprotégé :



Pf = 150 °C (dec)

[α]_D = +14.4 (0.25c, 1, CH₃OH)

UV (MeOH, nm) : λ_{max} = 299

Rf : 0.47 (acétate d'éthyle / méthanol / eau 7:2:1)

RMN ¹H (250 MHz, CD₃OD) : δ 8.33 (2H, d, J = 8.4 Hz), 7.86 (1H, s, CH=N(O)), 7.47 (2H, d, J = 8.5 Hz), 4.65 à 4.45 (4H, m, CH₂-NH, H-1', H-2), 4.3 (1H, m, H-3), 4.05 à 3.87 (2H, m, H-4 et H-5), 3.87 à 3.66 (7H, m, CH₂-OH, H-4' et CH₂-NH), 3.66 à 3.45 (3H, m, H-5', H-3' et H-2'), 2.55 à 2.40 (4H, m, CH₂-CH₂-Rf), 1.59 (6H, singulet, CH₃ du *tert*-butyl)

RMN ¹³C (62.86 MHz, CD₃OD) : δ 174.0, 171.9 (CO-NH), 142.1 (C^{IV} arom.), 134.6 (CH=N(O)), 129.7 (CH arom.), 129.2 (C^{IV} arom.), 126.9 (CH arom.), 104.4 (CH-1'), 82.0 (CH-4), 75.8 (CH-5'), 73.5 (C^{IV}), 73.4 (CH-3' ou CH-2'), 72.7 (CH-2), 71.8 (CH-5), 71.4 (CH-3' ou CH-2'), 71.2 (CH-3), 69.0 (CH-4'), 62.4 (CH₂-6), 61.3 (CH₂-6'), 46.3 (C^{IV}-CH₂-NH), 42.1 (C^{IV} arom.-CH₂-NH), 26.0 (CH₂-CH₂-Rf), 23.3 (CH₃ du *tert*-butyl)

RMN ^{19}F (235 MHz, CD_3OD) : δ -82.1 (CF_3 , s), -115.3 ($\text{CF}_2\text{-CH}_2$, s), -122.6, -123.6, -124.3 (CF_2 , s), -127.0 ($\text{CF}_2\text{-CF}_3$, s)

MS FAB $^+$ (935.7 g.mol $^{-1}$) : $[\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{F}_{13}\text{NO}]^+ = 446$ (1%), $[\text{C}_9\text{H}_4\text{F}_{13}\text{O}]^+ = 375$ (8%)

MS FAB $^-$ (35.7 g.mol $^{-1}$) : $[\text{M-H}] = 934$ (très faible)

Colonne préparative (Microsorb C18 – 21.4 mm / 250 mm) : $t_r = 9.800$

Gradient 70 MeOH - 30 H $_2$ O à 80 MeOH-20 H $_2$ O de $t = 0$ à $t = 5$ min

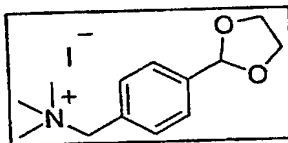
Gradient 80 MeOH - 20 H $_2$ O à 82 MeOH – 18 H $_2$ O de $t = 5$ à $t = 8$ min

Isocratique 82 MeOH -18 H $_2$ O a partir de $t = 8$ min

Débit 0.8 mL/min

3. Synthèse de la nitrone hydrocarbonée ionique B $_1$

a. Synthèse de l'iodure de [4-(1,3-Dioxolan)-2-yl-benzyl] triméthyl ammonium



1.25 g d'amine **E15** (7 mmol - 1 équiv.) sont dissous dans 4 mL de DMF dans un tube scellé. 2.58 g de tributylamine (14 mmol - 2 équiv) sont ensuite ajoutés en une fois sous agitation. Le milieu est refroidi à 0 °C et 5.2 g d'iodure de méthyle (35mmol

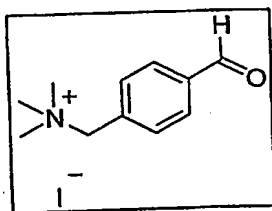
- 5 équiv) sont additionnés lentement au milieu. Le tube scellé est fermé et l'agitation est poursuivie à température ambiante pendant 20 heures. Le brut réactionnel est repris dans l'AcOEt et le précipité obtenu est filtré, repris dans l'éther puis à nouveau filtré. L'ammonium (1.7 g - 4.9 mmol - 70 %) est obtenu sous forme d'une poudre blanche.

RMN ^1H (250 MHz, DMSO- d_6) : δ 7.59 (4H, s, Harom.), 5.80 (H, s, H de l'acétal), 4.61 (2H, s, $\text{CH}_2\text{-NH}$), 4.2 à 3.9 (4H, AA'BB', $\text{CH}_2\text{-O}$), 3.06 (9H, s, $\text{CH}_3\text{-N}$)

RMN ^{13}C (62.86 MHz, DMSO- d_6) : δ 140.6 (C^{IV} arom.), 133.3 (CH arom) 129.6 (C^{IV} arom.), 127.5 (CH arom.), 102.7 (CH acétal), 67.6 ($\text{CH}_2\text{-N}$), 65.4 ($\text{CH}_2\text{-O}$), 52.2 ($\text{CH}_3\text{-N}$)

Analyse centésimale ($\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{NO}_2\text{I}$, 0.83 H $_2$ O) calculé C 41.69, H 4.60, N 4.42 trouvé C 41.69, H 4.58, N 4.31.

b. Synthèse de l'iodure de (4-Formyl-benzyl)-triméthyl-ammonium **E26**

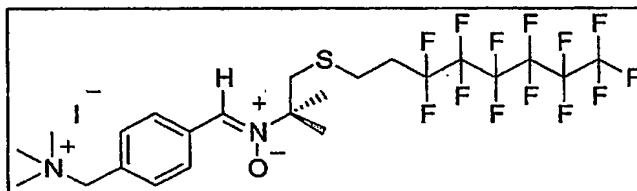


0.38 g du dioxolane ammonium (1.08 mmol - 1 équiv.) sont dissous dans 10 mL de mélange acide acétique/eau 1:1. Après 12 heures d'agitation le milieu réactionnel est évaporé sous vide et les traces de solvant sont éliminées à la pompe à palette. Le composé **E26** (0.34 g - 1.08 mmol - rdt quantitatif) est obtenu sous forme d'une poudre brune foncée.

RMN ^1H (250 MHz, DMSO- d_6) : δ 10.12 (1H, s, CHO), 8.06 (2H, d, J = 8 Hz, H arom.), 7.80 (2H, d, J = 8 Hz, H arom.), 4.69 (2H, s, $\text{CH}_2\text{-NH}$), 3.09 (9H, s, $\text{CH}_3\text{-N}$)

RMN ^{13}C (62.86 MHz, DMSO- d_6) : δ 193.4 (CHO), 137.6, 134.8 (C^{IV} Arom), 134.1, 130.2 (CH Arom), 62.2 (CH_2N), 52.6 (CH_3N)

c. Synthèse de la nitrone ionique fluorocarbonée B2



0.25 g de composé **E26** (0.82 mmol - 1 équiv.) et 0.48 g d'hydroxylamine **E7b** (1.02 mmol - 1.25 équiv.) sont mis en solution dans 5 mL de pyridine dégazé à l'argon. Le milieu réactionnel est porté à 80°C à l'obscurité sous atmosphère d'argon pendant 42 heures. Le mélange réactionnel est ensuite évaporée sous pression réduite et les traces de pyridine sont éliminées à la pompe à palette. La nitrone est obtenue sous forme de poudre blanche (0.35 g - 0.47 mmol - 57 %) après deux cristallisations successives dans un mélange MeOH/éther. P_f = 171-173

RMN ^1H (250 MHz, CD_3OD) : δ 8.54 (2H, d, J = 8.4 Hz, Harom.), 8.03 (1H, s, $\text{CH}=\text{N}(\text{O})$), 7.71 (2H, d, J = 8.4 Hz, Harom.), 4.65 (2H, s, $\text{CH}_2\text{-N}$), 3.18 (11H, s, $\text{CH}_3\text{-N} + \text{C}^{\text{IV}}\text{-CH}_2\text{-S}$), 2.7 (2H, m, $\text{CH}_2\text{-S}$), 2.45 (2H, m, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-Rf}$), 1.71 (6H, s, CH_3 du *tert*-Butyl)

RMN ^{13}C (62.86 MHz, CD_3OD) : δ 133.3 (C^{IV} arom.), 132.8 ($\text{CH}=\text{N}(\text{O})$), 132.7 (CH arom.), 129.8 (C^{IV} arom.), 129.7 (CH arom.), 73.9 (C^{IV}), 68.5 ($\text{CH}_2\text{-N}$), 51.9, 51.9, 51.8 ($\text{CH}_3\text{-N}$), 41.3 ($\text{CH}_2\text{-S}$), 31.9 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-Rf}$), 24.6 (CH_3 *tert*-butyl), 23.0 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-Rf}$)

RMN ^{19}F (235 MHz, CD_3OD) : δ -82.3 (CF_3 , singulet), -115.2 ($\text{CF}_2\text{-CH}_2$, singulet), -112.9, -123.9, -124.3 (CF_2 , singulet), -127.3 ($\text{CF}_2\text{-CF}_3$, singulet)

UV (MeOH, nm) : $\lambda_{\text{max}} = 304$ nm

HR MS FAB^+ (754.4 g.mol^{-1}) : m/z théorique : 755.0838 pour

5 $\text{C}_{23}\text{H}_{29}\text{F}_{13}\text{IN}_2\text{OS}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$)

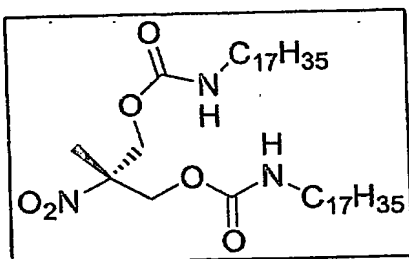
m/z observé : 755.0851

MS FAB^+ (754.4 g.mol^{-1}) : $[\text{2M}+\text{H}]^+ = 1510$, $[\text{2M-I}]^+ = 1381$ (5%),

$[\text{M}+\text{H}]^+ = 755$ (2.5%), $[\text{M-I}]^+ = 627$ (100%), $[\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{F}_{13}\text{S}]^+ = 435$ (100%)

4. Synthèse de la nitrone bicaténaire hydrocarbonée C1

10 a. Synthèse de l' Heptadecyl-carbamic acid 3-heptadecylcarbamyloxy-
2-methyl-2-nitro-propyl ester **E9a**



15

6.31 g d'acide stéarique (0.022 mol - 3 équiv) sont mis en suspension dans 50 mL de toluène anhydre sous atmosphère d'argon. 2.47 g de triéthylamine (0.024 mol - 3.3 équiv) et 6.71 g de diphenylphosphoryl azide (0.024 mol - 3.3 équiv.) sont additionnés et le milieu est porté à 60 °C. Après 2 heures d'agitation, 1 g de 2-nitro-2-méthyl-1,3-propanediol (0.0074 mol - 1 équiv.) et une pointe de spatule de DABCO sont mis en suspension et l'agitation est poursuivie pendant 12 heures. Le brut réactionnel est dilué avec 100 mL d'acétate d'éthyle, lavé par 3 fois 50 ml d'HCl 1N, 3 fois 50 mL de NaHCO₃ saturée et enfin lavé par 2 fois 50 mL de saumure. La phase organique est séchée sur Na₂SO₄ et évaporée sous pression réduite. Après 3 cristallisations successives le composé **E9a** (2.02 g -2.89 mmol - 40 %) est obtenu sous forme d'une poudre blanche. Pf : 75-76.2 °C

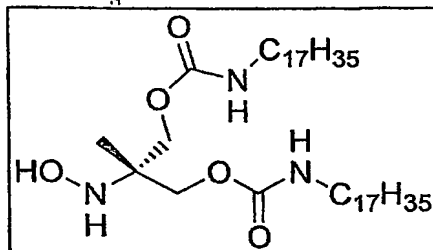
Rf : 0.42 (cyclohexane/acétate d'éthyle 8:2)

30 RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3) : δ 4.77 (2H, m, NH), 4.45 (2H, système AB, $\text{CH}_2\text{-O}$), 3.15 (2H, q, $J=9.8$ Hz, $\text{CH}_2\text{-NH}$), 1.59 (3H, s, CH_3 du *tert*-butyl), 1.47 (2H, m, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$), 1.24 (55H, m, CH_2 de la chaîne), 0.87 (3H, t, CH_3 de la chaîne)

35 RMN ^{13}C (62.86 MHz, CDCl_3) : δ 155.1 (CO), 88.1 (C^{IV}), 65.1 ($\text{CH}_2\text{-O}$), 41.3 ($\text{CH}_2\text{-NH}$), 31.9, 29.8, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3 (CH_2 de la chaîne), 26.7 (CH_3 du *tert*-butyl), 22.7, 18.5 (CH_2 de la chaîne), 14.1 (CH_3 de la chaîne)

Infra-rouge (KBr, cm^{-1}) : $\nu_{\text{NH}} = 3392$, $\nu_{\text{CO}} = 1720$ et 1703 , $\nu_{\text{NO}_2} =$

b. Synthèse de l' heptadecylcarbamoyl 3-heptadecylcarbamoyloxy-2-hydroxylamino-2-méthyl-propyl ester **E9b**



La procédure expérimentale est identique à celle utilisée pour synthétiser les composés **E5b** et **E7b**.

1.39 g de composé nitro **E9a** (2.0 mmol - 0.25 équiv) en solution dans 20 mL de mélange THF/MeOH, sont additionnés à 80 mL du réactif de Kagan.

Après traitement et purification par chromatographie sur gel de silice (éluant: dichlorométhane/acétate d'éthyle 10:0 à 5:5), l'hydroxylamine **E9b** (0.8 g - 1.17 mmol - 60%) est obtenue sous forme d'une poudre blanche.

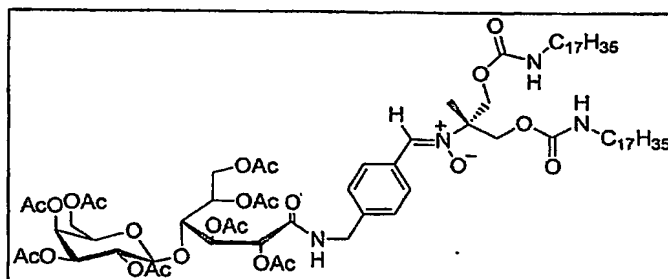
0.24 g du composé **E9a** de départ sont également recueillis et permettent d'obtenir un taux de conversion de 71 %. Pf = 80-81.6 °C

Rf : 0.51 (cyclohexane / acétate d'éthyle 5 : 5)

RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃) : δ 4.83 (2H, t, J = NH), 4.45 (4H, système AB, CH₂-O), 3.17 (4H, q, J = 9.8 Hz, CH₂-NH), 1.49 (2H, m, CH₂-CH₂-NH), 1.25 (55H, m, CH₂ de la chaîne), 1.07 (3H, s, CH₃ du *tert*-butyl), 0.88 (3H, t, CH₃ de la chaîne)

RMN ¹³C (62.86 MHz, CDCl₃) : δ 156.7 (CO), 88.1 (C^{IV}), 64.7 (CH₂-O), 41.2 (CH₂-NH), 31.9, 29.8, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3 (CH₂ de la chaîne), 26.8 (CH₃ du *tert*-butyl), 22.7, 16.8 (CH₂ de la chaîne), 14.1 (CH₃ de la chaîne)

c. Synthèse de la nitrone biantennée hydrocarbonée **C1**



0.5 g d'aldéhyde **E20** (0.616 mmol - 1 équiv.) sont mis en solution en présence de tamis moléculaire 4 Å et de 0.3 g d'hydroxylamine **E9b** (0.44 mmol - 0.71 équiv.) dans 6 mL de THF anhydre et dégazé. 1.2 mL d'acide acétique glacial est additionné et le milieu est chauffé à 50 °C sous argon à l'abri de la lumière.

Après 48 et 96 heures 0.2 g d'hydroxylamine (0.29 mmol – 0.47 équiv) sont rajoutés et le milieu réactionnel est filtré sur célite au bout de 5 jours de réaction.

Les purifications par chromatographie flash sur gel de silice (éluant : Acétate d'éthyle/dichlorométhane 7:3 à 8:2) et par chromatographie d'exclusion sur résine Séphadex LH-20 (éluant : Ethanol/Dichlorométhane 1:1) permettent d'obtenir la

5 nitrone de type C (0.58 g – 0.392 mmol-63 %), quasi exempte de traces d'aldéhyde, sous forme de poudre blanche. 80 mg d'aldéhyde pur sont également récupérés permettant de déterminer un taux de conversion de 76 %. $[\alpha]_D = +16.9^\circ$ (c, 1, CHCl_3) à 20°C .

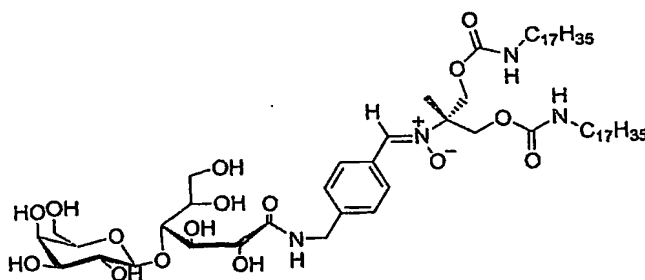
Rf : 0.37 (Acétate d'éthyle/Dichlorométhane 8:2)

10 RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3) : δ 8.28 (2H, d, $J = 8.1$ Hz, H arom.), 7.45 (1H, s, $\text{CH}=\text{N}(\text{O})$), 7.31 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H arom.), 6.65 (1H, t, $J = 5.8$ Hz, NH amide), 5.75 à 5.55 (2H, m, H-2 et H-3), 5.35 (1H, d, $J = 3$ Hz), 5.25 à 4.80 (5H, m, H-2', H-5, H-3' et NH uréthane), 4.70 à 4.25 (9H, m, H-1', H-6a et H-7a, H-4, H-7b et $\text{CH}_2\text{-O-CO-NH}$), 4.20 à 3.80 (4H, m, H-6b, H-6'a, H-6'b et H-5'), 3.14 (4H, dd, $J = 6.7$ Hz, $\text{CH}_2\text{-NH-CO-O}$), 2.16, 2.15, 2.09, 2.05, 2.04, 1.98, 1.92 (24H, 8s, $\text{CH}_3\text{-CO}$), 1.60 (3H, s, CH_3 du *tert* butyl), 1.55 à 1.10 (60H, m, CH_2 de la chaîne), 0.87 (6H, t, $J = 6.4$ Hz, CH_3 de la chaîne)

15 RMN ^{13}C (250 MHz, CDCl_3) : δ 170.6, 170.3, 170.2, 170.0, 169.9, 169.8, 169.4, ($\text{CH}_3\text{-CO}$), 167.3 (CO-NH), 155.7 (O-CO-NH), 140.3 ($\text{C}^{\text{IV}}\text{arom.}$), 132.4 ($\text{CH}=\text{N}(\text{O})$), 130.0 (C^{IV} ou CH arom.), 129.6 (C^{IV} ou CH arom.), 127.8 (CH arom.), 101.9 (CH-1'), 77.4 (CH-4), 75.1 (C^{IV}), 71.7 (CH-2), 71.1 (CH-5' et CH-3'), 69.9 (CH-5), 69.3 (CH-3), 69.1 (CH-2), 66.9 (CH-4'), 65.5 ($\text{CH}_2\text{-O-CO-NH}$), 61.8 et 61.0 ($\text{CH}_2\text{-OAc}$), 43.2 ($\text{CH}_2\text{-NH}$), 41.3 ($\text{CH}_2\text{-NH-CO-O}$), 32.0, 29.9, 29.8, 29.7, 29.7, 29.6, 29.4, 29.3 (CH_2 de la chaîne), 26.8 (CH_3 du *tert*-Butyl), 22.8 (CH_2 de la chaîne), 20.9, 20.9, 20.8, 20.7, 20.7, 20.6 ($\text{CH}_3\text{-CO}$), 14.2 (CH_3 bout de chaîne)

25 MS FAB $^+$ (1477.8 g.mol $^{-1}$) : $[\text{M}+\text{H}] = 1478$ (16 %), $[\text{M}+\text{Na}] = 1500$ (6 %).

Après désacétylation des sucres par la méthode de Zemplen on obtient le produit déprotégé :



La purification de la nitrone C_1 est réalisée flash par chromatographie sur gel de silice (éluant : chloroforme/méthanol/eau 8:2:0.1) puis par chromatographie d'exclusion de taille sur Sephadex LH-20 (éluant : dichlorométhane/méthanol 7:3).

$[\alpha]_D = +7.6^\circ$ (0.25c, 1, CHCl_3)

5 Rf : 0.28 (chloroforme/méthanol/eau 8:2:0.1)

Pf = 190 °C (déc)

RMN ^1H (250 MHz, DMSO- d_6) : δ 8.28 (2H, d, $J = 8.2$ Hz, H arom.), 8.07 (1H, t, $J = 6.3$ Hz, NH amide), 7.72 (1H, s, $\text{CH}=\text{N}(\text{O})$), 7.35 (2H, d, $J = 8.3$ Hz, H arom.), 7.08 (2H, m, NH uréthane), 4.60 à 4.00 (9H, m, $\text{CH}_2\text{-NH}$, $\text{CH}_2\text{-O-CO-NH}$, H-1', H-2 et H-3), 3.78 (2H, m, H-4 et H-5), 3.70 à 3.40 (8H, m, $\text{CH}_2\text{-OH}$, H-2', H-3', H-4' et H-5'), 2.94 (4H, m, $\text{CH}_2\text{-NH-CO-O}$), 1.54 (3H, s, CH_3 du *tert*-butyl), 1.45 à 1.10 (60H, m, CH_2), 0.87 (6H, t, $J = 6.6$ Hz, CH_3)

10 RMN ^{13}C (62.86 MHz, DMSO- d_6) : δ 173.0 (CO-NH), 156.1 (O-CO-NH), 142.3 (C^{IV} arom.), 132.1 ($\text{CH}=\text{N}(\text{O})$), 130.0 (C^{IV} arom.), 129.1 (CH arom.), 127.2 (CH arom.), 105.1 (CH-1'), 83.4 (CH-4), 76.2 (CH-5'), 74.9 (C^{IV}), 73.7 (CH-3' ou CH-2'), 72.6 (CH-2), 71.9 (CH-5), 71.6 (CH-3' ou CH-2'), 71.1 (CH-3), 68.7 (CH-4'), 65.1 ($\text{CH}_2\text{-O-CO-NH}$), 62.8, 61.1 ($\text{CH}_2\text{-6}$ et $\text{CH}_2\text{-6'}$), 42.2 ($\text{CH}_2\text{-NH}$), 40.7 ($\text{CH}_2\text{-NH-CO-O}$), 31.8, 29.8, 29.6, 29.2 (CH_2 de la chaîne), 26.7 (CH_3 du *tert*-butyl), 22.6 (CH_2 de la chaîne), 14.4 (CH_3 de la chaîne)

20 MS FAB $^+$ (1140.77 g.mol $^{-1}$) : $[\text{M} + \text{Na}] = 1164$, $[\text{M} + \text{H}] = 1142$

III-Mesure de l'hydrophobie des molécules de l'invention :

L'un des objectifs de l'invention est de moduler la HLB de pièges à radicaux libres afin de favoriser le passage transmembranaire et le transport *in vivo*.

25 Dans cette optique il était important de déterminer le coefficient de partition P de ces composés.

En effet, Hansch et ses collaborateurs (Hansch, C.; Steward, A. R.; Anderson, S. M.; Bentley, D. *J. Med. Chem.* 11, 1 (1968)) ont pu établir au cours d'une étude sur l'efficacité d'action de différents hypnotiques en fonction de leur hydrophobie la relation suivante:

30
$$\log 1/C = -k(\log P)^2 + k'(\log P) + k''$$

C : la concentration molaire produisant une réponse biologique standard

k , k' et k'' : des constantes déterminées par la méthode des moindres carrés.

35 Ainsi plus un composé sera hydrophobe, plus la valeur $\log P$ sera supérieur à 0 et plus les interactions avec la phase lipidique seront élevées.

Nous avons déterminé le coefficient de partition de ces nitrones par Chromatographie Liquide Haute Performance en Phase Inverse. (Lambert, W. J. J.

Chromtogr. 656, 469 (1993); Dorsey, J. G.; Kahaledi, M. G. *J. Chromtogr.* 656, 485 (1993)).

Thomas a également utilisé cette approche chromatographique pour déterminer l'hydrophobie de spin traps cycliques dérivés de la PBN (Fevig, T. L.; Bowen, S. M.; Janowick, D. A.; Jones, B. K.; Munson, H. R.; Ohlweiler, D. F.; Thomas, C. E. *J. Med. Chem.* 39, 4988 (1996)) L'estimation du coefficient de partition Octanol/eau par HPLC en phase inverse (K_{ow}) est hautement dépendante du temps de rétention des composés et par la suite du coefficient de capacité k' . Il peut être exprimé par la relation suivante:

$$\log K_{ow} = a \log k' + b$$

Dans laquelle a et b sont des constantes empiriques qui caractérisent le système de solvant.

Expérimentalement k' est déterminé par la formule suivante. pour différents mélanges éluant méthanol/eau.

$$k' = (t_R - t_0) / t_0$$

dans laquelle t_R représente le temps de rétention de l'échantillon et t_0 le temps d'élution de la phase mobile

Il convient ensuite d'extrapoler par régression linéaire la valeur de k' pour une phase composée par 100 % d'eau afin d'obtenir la valeur k_w .

Nous avons procédé de cette manière pour les composés dérivés de l'acide lactobionique de type A. Nous avons également par souci de comparaison et de validation de notre modèle, déterminé l'hydrophobie de la PBN et de la TA1PBN.

Le tableau 3 résume les valeurs de temps de rétention moyen obtenu à partir d'un minimum de 3 valeurs établies au minimum sur 2 jours différents.

La régression linéaire des valeurs de k' obtenue suivant les phases mobiles utilisées permet d'obtenir une équation de droite du type :

$$y = ax + b$$

dans laquelle y représente $\log k'$ et a représente $\log k'_w$
 x représente la fraction en méthanol de l'éluant.

Phase Mobile (MeOH/H ₂ O)	60/40		70/30		80/20		90/10	
Nitrone (C en mg/ml)	225 – 235 bars		200 – 220 bars		175 - 195 bars		140 - 160 bars	
	t_R	$\log k'$	t_R	$\log k'$	t_R	$\log k'$	t_R	$\log k'$
MEOH	3.98		3.97		3.94		3.89	
PBN (0.64 mg/ml)	7.98	0.0019	6.09	-0.2711	5.07	-0.5405	4.47	-0.8203
TA1PBN (0.26 mg/ml)	-	-	28.92	0.7985	8.46	0.0593	4.85	-0.6057
A2 (0.52 mg/ml)	-	-	22.43	0.6676	9.06	0.1140	5.31	-0.4344
A3 (0.52 mg/ml)	-	-	29.28	0.8047	9.04	0.1119	4.87	-0.5967
A1 (0.48 mg/ml)	9.98	0.1776	6.14	-0.2624	4.76	-0.6840	-	-
A4 (0.57 mg/ml)	41.41	0.9731	12.64	0.3394	6.12	-0.2562	-	-
A5 (0.52 mg/ml)	8.21	0.0264	5.51	-0.4143	4.49	-0.8524	-	-

Tableau 3: Détermination des valeurs de $\log k'$ par HPLC

Nous avons procédé de la même manière pour les 4 autres dérivés et les résultats sont résumés dans tableau suivant (tableau 4).

5

	a	R ²	$\log k'_w$
PBN	-2.7366	0.9999	1.6447
TA1PBN	-7.0209	0.9991	5.7008
A ₂	-5.5098	1	4.5235
A ₃	-7.0079	1	5.7129
A ₁	-4.3082	0.9998	2.7595
A ₄	-6.1468	0.9997	4.6549
A ₅	-4.3942	1	2.6635

Tableau 4 : Détermination des valeurs de $\log k'_w$ par HPLC

Dans un souci de clarté nous avons reporté les valeurs de $\log k'_w$ des différentes nitrone sur un histogramme (Figure 11).

10

Les résultats obtenus nous permettent d'effectuer plusieurs remarques et conclusions:

15

1- Pour les composés à chaînes hydrocarbonées, les valeurs obtenues sont en accord avec nos attentes. Plus la chaîne comporte d'atomes de carbones plus l'hydrophobie est élevée. D'autre part la nature des jonctions de chaîne joue un rôle non négligeable dans la valeur du $\log k'$, une liaison amide ou uréthane étant par nature plus polaire qu'une jonction thioéther. On obtient donc en terme d'hydrophobie le classement croissant suivant :

$$A_5 < A_1 < A_2$$

2- Pour les composé fluorés, le composé A_3 présente une plus grande affinité pour les milieux lipidiques que le composé A_4 ce qui semble en accord avec leur valeurs de CMC respectives. Cependant, les composés A_3 et A_4 possèdent des valeur de $\log k'_w$ proches alors que leurs valeurs de CMC varient de plus du double. Ceci provient de la nature des chaînes fluorés qui présentent des propriétés tensioactives particulières. Il convient donc de bien séparer notion de tensioactivité et notion d'hydrophobie. On obtient donc en terme d'hydrophobie le classement croissant suivant :

10

$$A_5 < A_1 < A_2 < A_4 < A_3$$

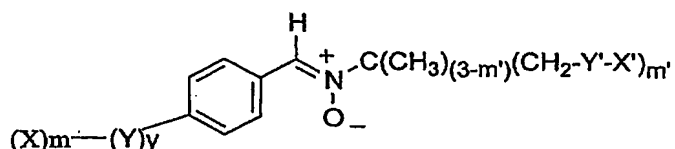
3- la valeur de $\log k'_w$ de la PBN est sensiblement plus faible que l'ensemble des composés synthétisés. Selon la théorie de Hansch, nous pouvons en déduire une meilleure pénétration trans membranaire des composés et donc une meilleure activité de piège à radicaux libres.

15

4- La valeur de $\log k'_w$ de la TA1PBN est sensiblement identique à celle du composé A_3 .

REVENDICATIONS

1. Composé, caractérisé en qu'il répond à la formule (I) :



(I)

dans laquelle :

X représente un groupement hydrophile choisi parmi un mono ou un polysaccharide, ainsi que les dérivés aminés de mono et de polysaccharides, une chaîne polyoxyde d'éthylène, une chaîne peptidique, un groupement polaire ionique choisi parmi un ammonium quaternaire, un oxyde d'amine, un groupement carnitine ;

m représente un entier égal à 1, 2 ou 3 ;

Y représente un bras espaceur destiné à relier le noyau aromatique et les substituants hydrophiles X ;

Y est choisi parmi les fonctions ester, amide, urée, uréthane, éther, thio-éther, amine, les chaînes hydrocarbonées en C₁-C₆, éventuellement interrompues par une ou plusieurs fonctions ester, amide, urée, uréthane et par un ou plusieurs ponts éther, amine ou thio-éther ;

y représente un entier égal à 0 ou à 1 ;

Y' représente un groupement choisi parmi une fonction ester, une fonction amide, une fonction urée, une fonction uréthane, un pont éther, un pont thio-éther ;

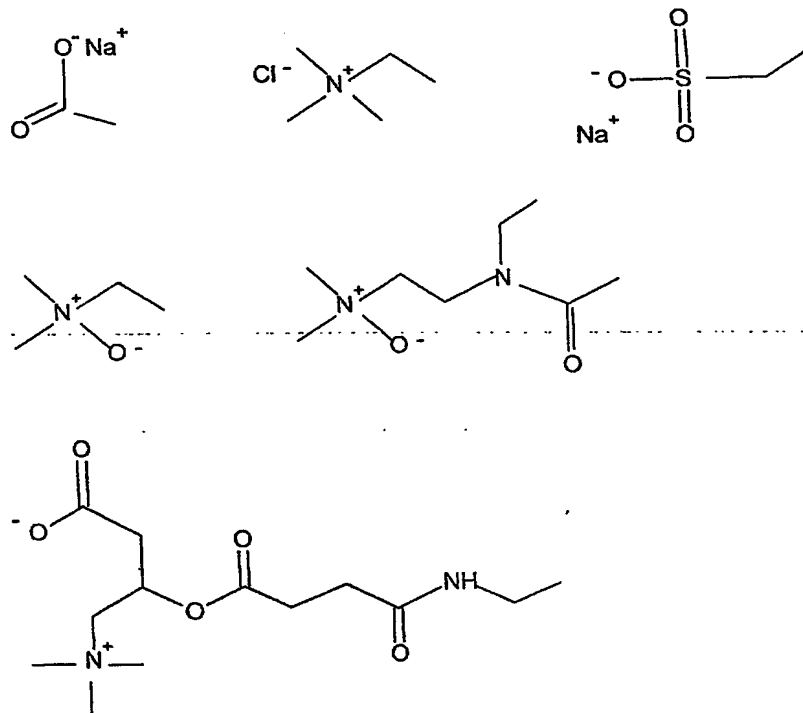
m' est un entier choisi parmi 1 et 2 ;

X' représente un atome d'hydrogène ou une chaîne alkyle en C₄-C₁₄ éventuellement substituée par un ou plusieurs atomes de fluor.

2. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce que X représente un groupement choisi parmi : le glucose, le lactose, le fructose, le mannose, le galactose, le ribose, le maltose, la glucosamine, le saccharose et le lactobionamide.

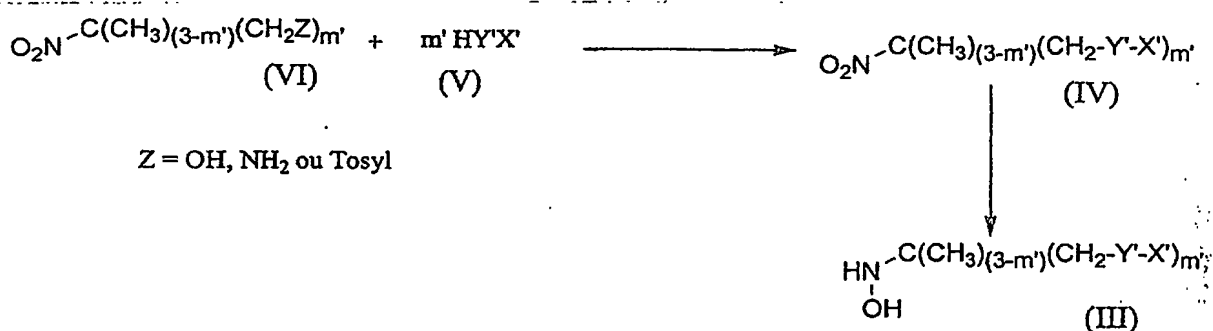
3. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce que X représente un groupement choisi parmi les chaînes polyoxyde d'éthylène comprenant de 30 à 100 unités oxyde d'éthylène, de préférence de 50 à 60 unités.

4. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce que X représente un groupement choisi parmi



5. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'une ou moins
- 5 des conditions ci-dessous est satisfaite :
- X représente un groupement choisi parmi : la lactobionamide, la carnitine ou une chaîne polyoxyéthylène ;
- m représente 1 ;
- m' représente 1 ou 2 ;
- 10 X' est choisi parmi les groupements octyl, décyl, dodécyl, $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_r\text{CH}_2\text{CH}_2-$ $8 \leq r \leq 6$.
6. Procédé de préparation d'un composé répondant à la formule (I) selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, ce procédé étant caractérisé en ce que l'on fait
- 15 réagir un aldéhyde répondant à la formule (II) avec une hydroxylamine répondant à la formule (III) suivant le schéma 2 ci-dessous :

7. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que le composé de
5 formule (III) est préparé suivant un procédé décrit dans le schéma 3 :



8. Composition pharmaceutique comprenant au moins un composé
répondant à la formule (I) selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 dans un support
pharmaceutiquement acceptable.

15 10. Utilisation d'un composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 pour la préparation d'un médicament destiné à la prévention ou au traitement des pathologies liées au stress oxydatif et à la formation des espèces radicalaires oxygénées.

12. Composition cosmétique, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un composé répondant à la formule (I) selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 dans un support cosmétiquement acceptable.

13. Procédé de traitement cosmétique pour prévenir et/ou traiter les effets du vieillissement, caractérisé en ce que l'on applique sur la peau ou sur les phanères une composition selon la revendication 12.

- 5 14. Utilisation d'un composé répondant à la formule (I) selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, en synthèse organique comme capteur de radicaux libres dans des réactions radicalaires.
-

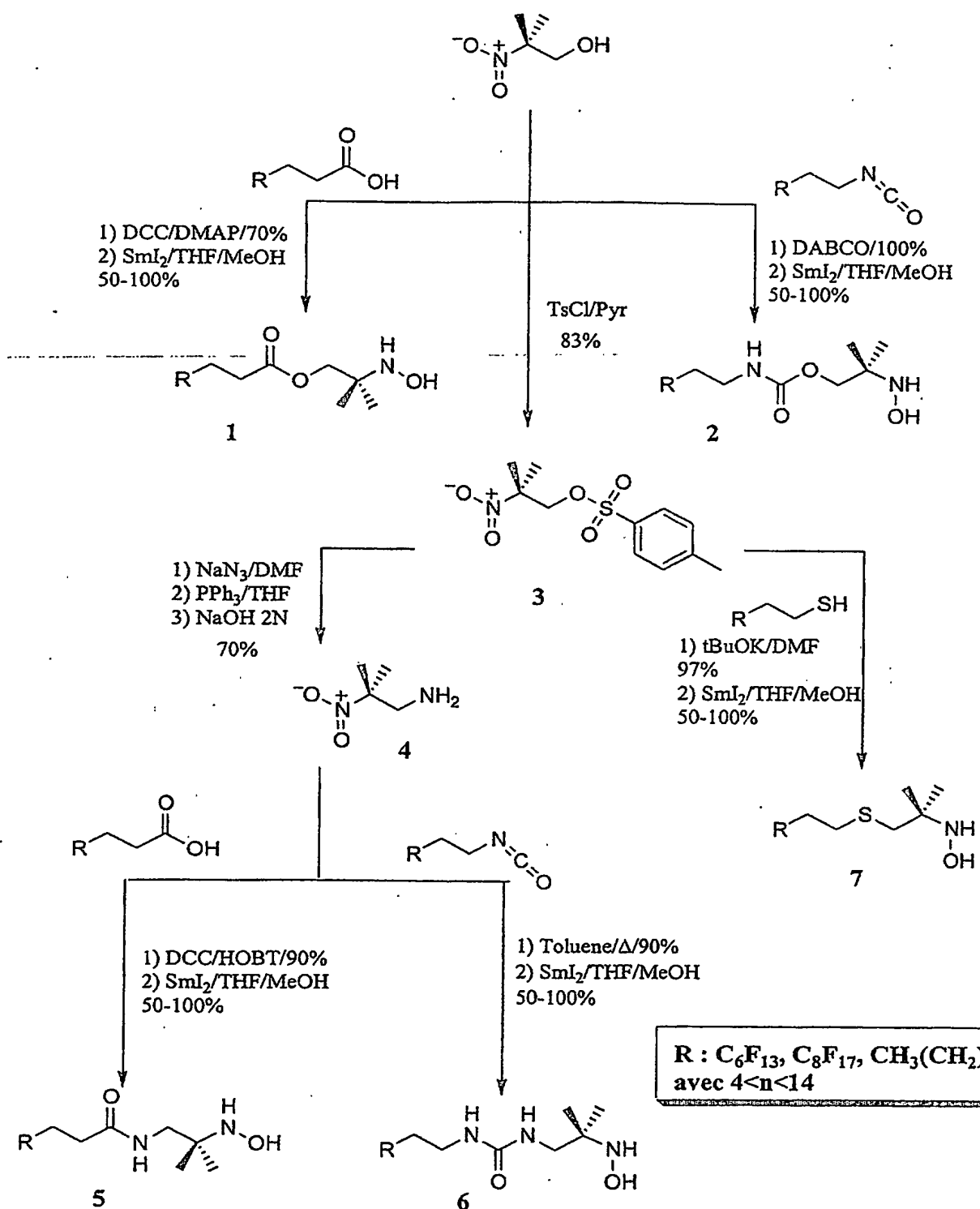


Figure 1 : synthèse des parties hydrophobes monocaténares hydro et perfluorocarbonées

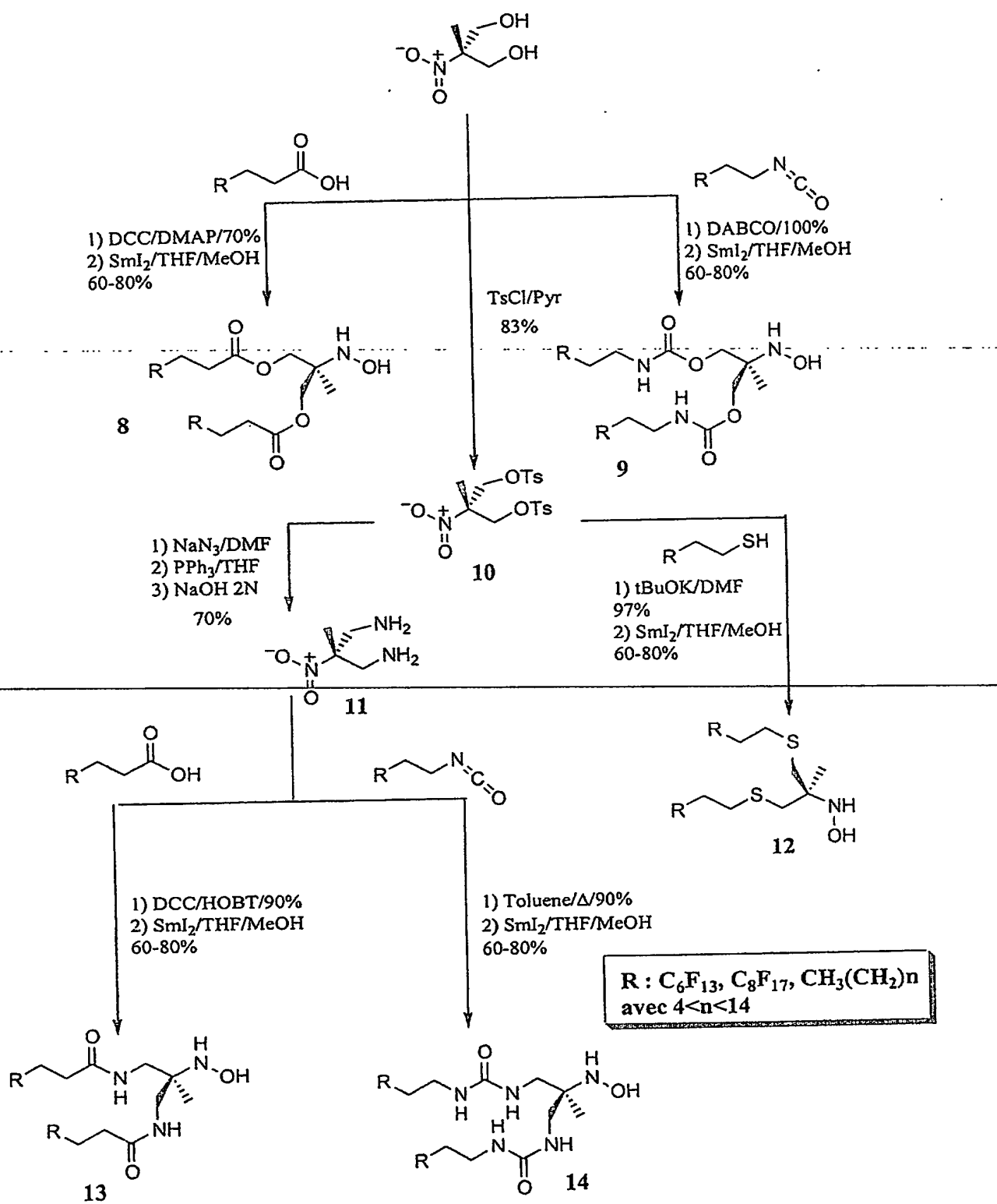


Figure 2 : synthèse des parties hydrophobes bicaténaires hydro et perfluorocarbonées

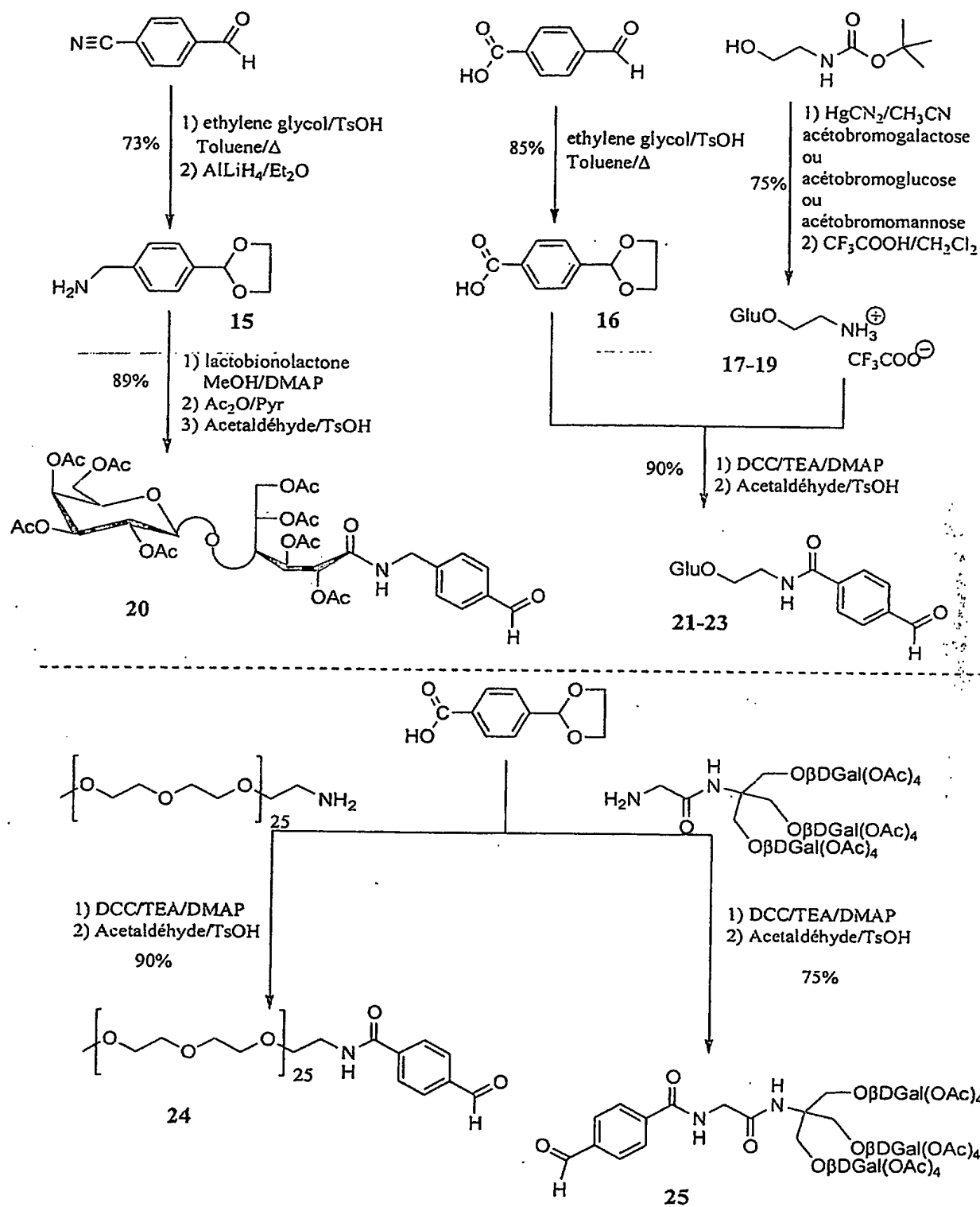
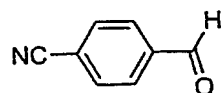
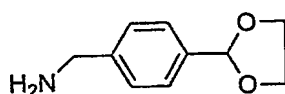


Figure 3 : synthèse des têtes polaires non ioniques

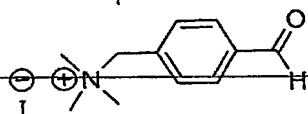


73%
1) ethylene glycol/TsOH
Toluène/ Δ
2) $\text{AlLiH}_4/\text{Et}_2\text{O}$



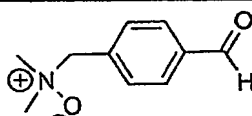
15

70 %
1) MeI (3 eq)
 Bu_3N (2 eq)
DMF
2) $\text{AcOH}/\text{H}_2\text{O}$: 1/1



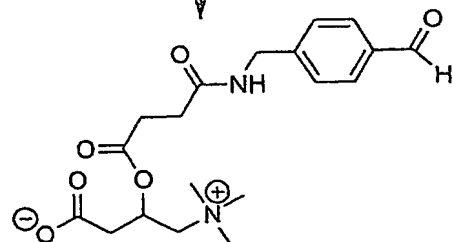
26

70 %
1) MeI (2 eq)
 Bu_3N (2 eq)
DMF
2) $\text{H}_2\text{O}_2/\text{MeOH}$
3) $\text{AcOH}/\text{H}_2\text{O}$: 1/1

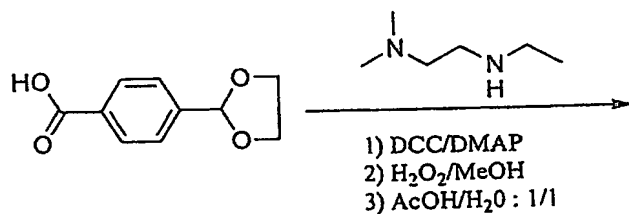


27

60 %
1) anhydride succinique
pyridine
2) carnitine/DMF/DCC
3) $\text{AcOH}/\text{H}_2\text{O}$: 1:1



28



29

Figure 4 : synthèse des têtes polaires ioniques

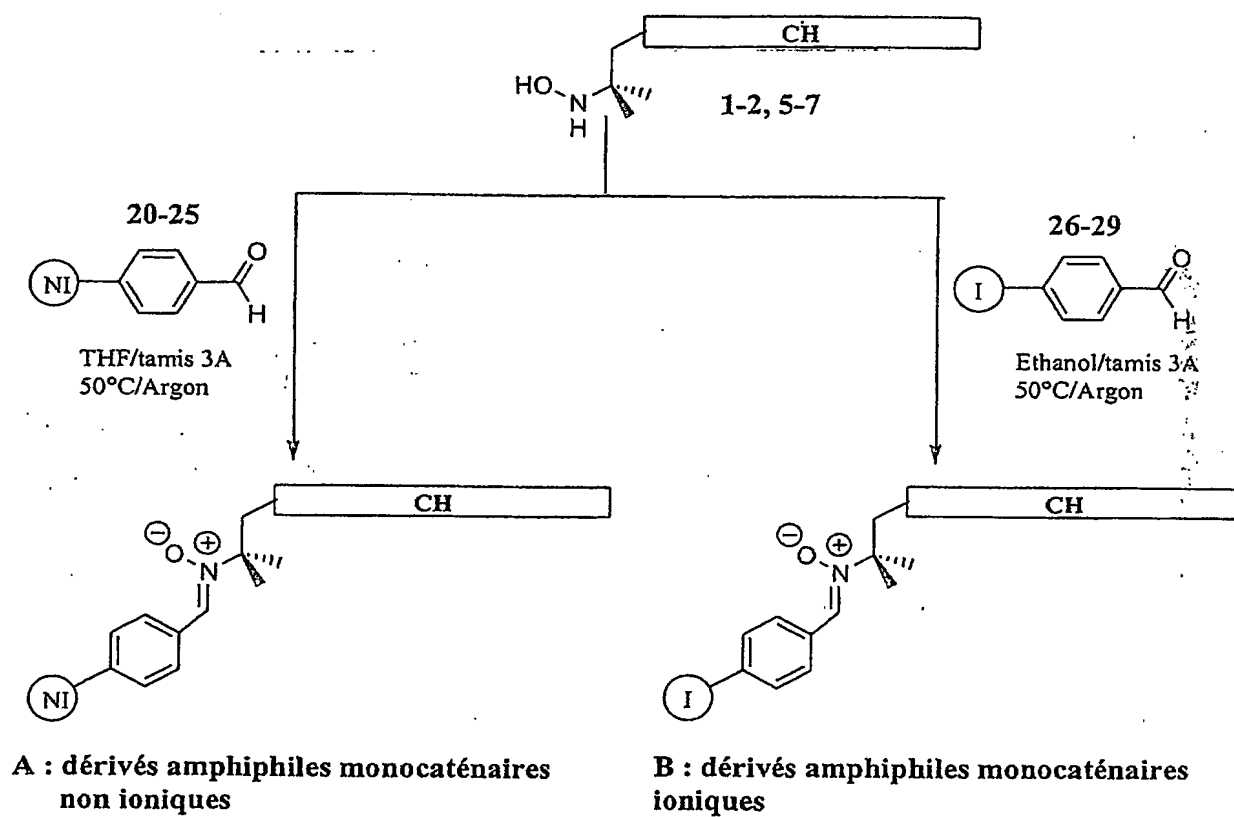


Figure 5 : synthèse des nitrones amphiphiles monocaténaires A-B

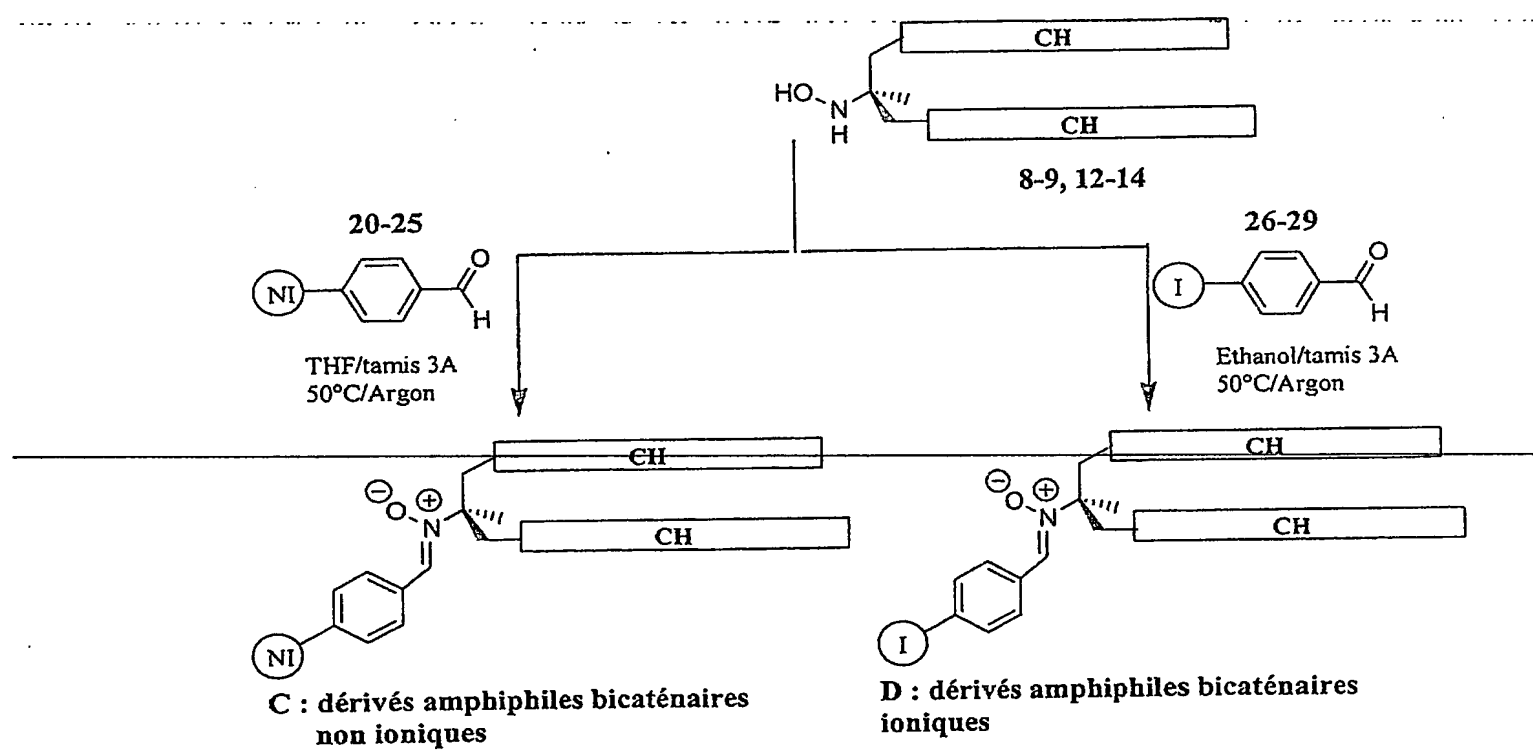
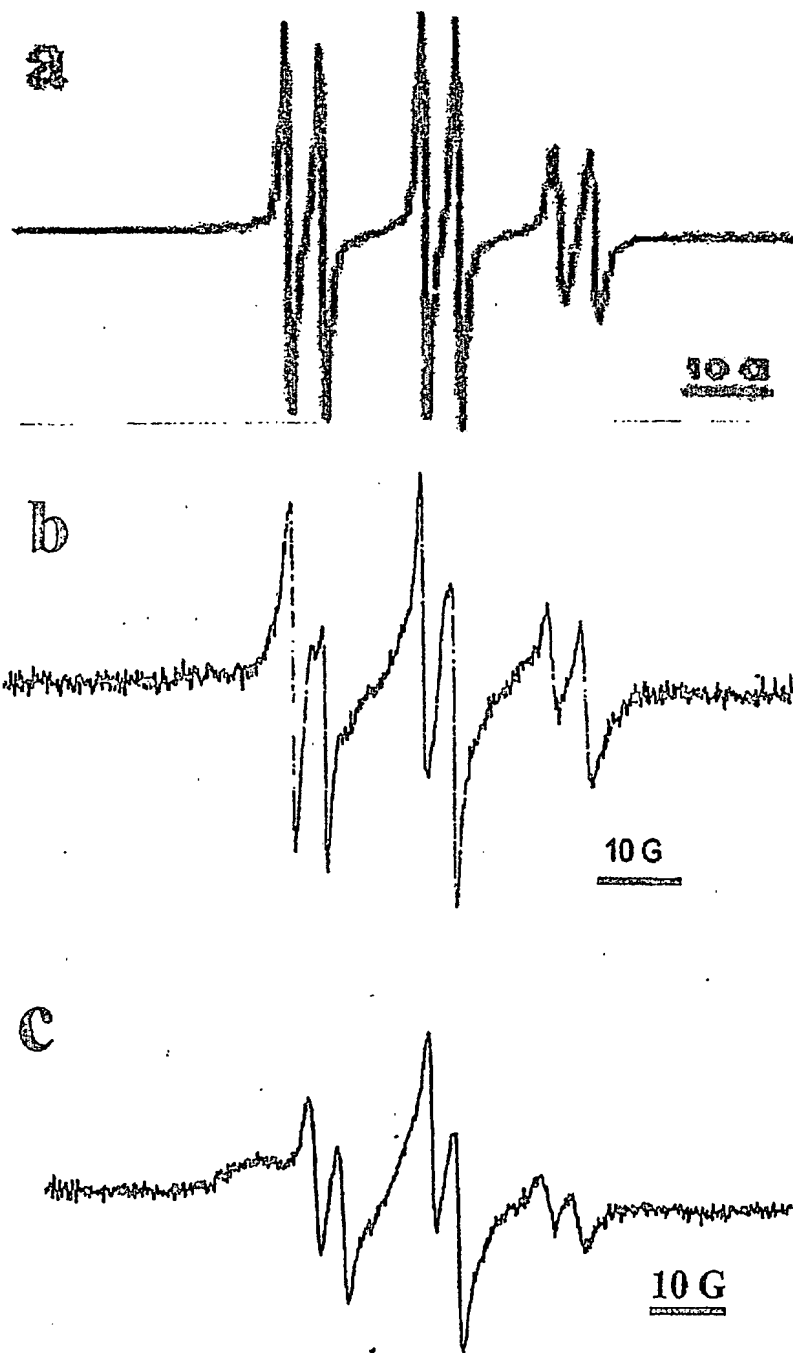


Figure 6 : synthèse des nitrones amphiphiles bicaténaires C-D



5 **Figure 7 :** Spectres RPE des adduits carboxylate (a), hydroxyle (b) et méthyle (c) générés respectivement par la réaction de Fenton (b) en présence de formiate (a) et de DMSO (c) et du composé A₁

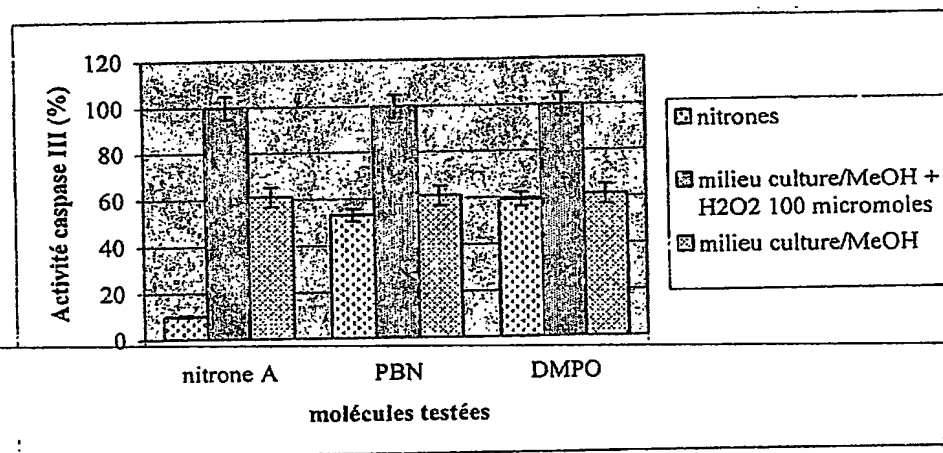


Figure 8 : activité caspase III de cellules neuronales intoxiquées par H₂O₂ et traitées par des nitrones commerciales et la nitrone de type A2

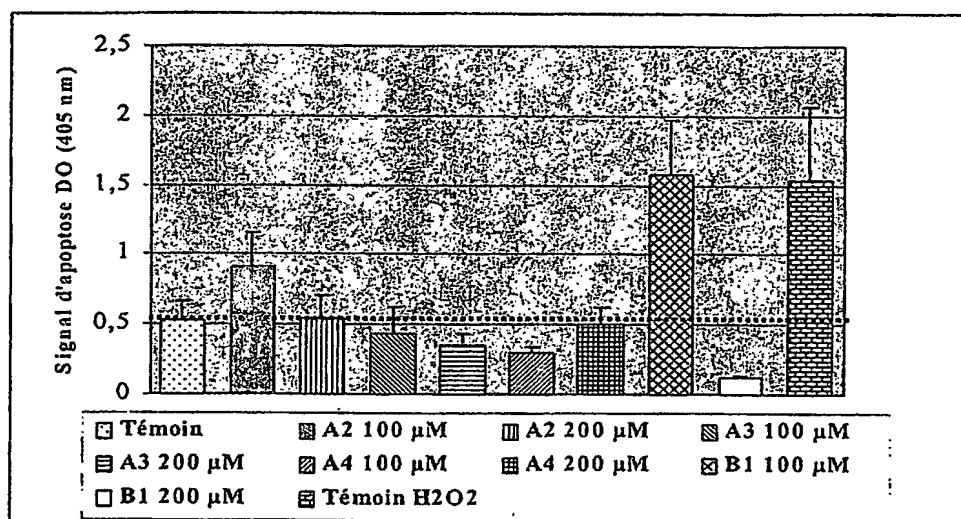
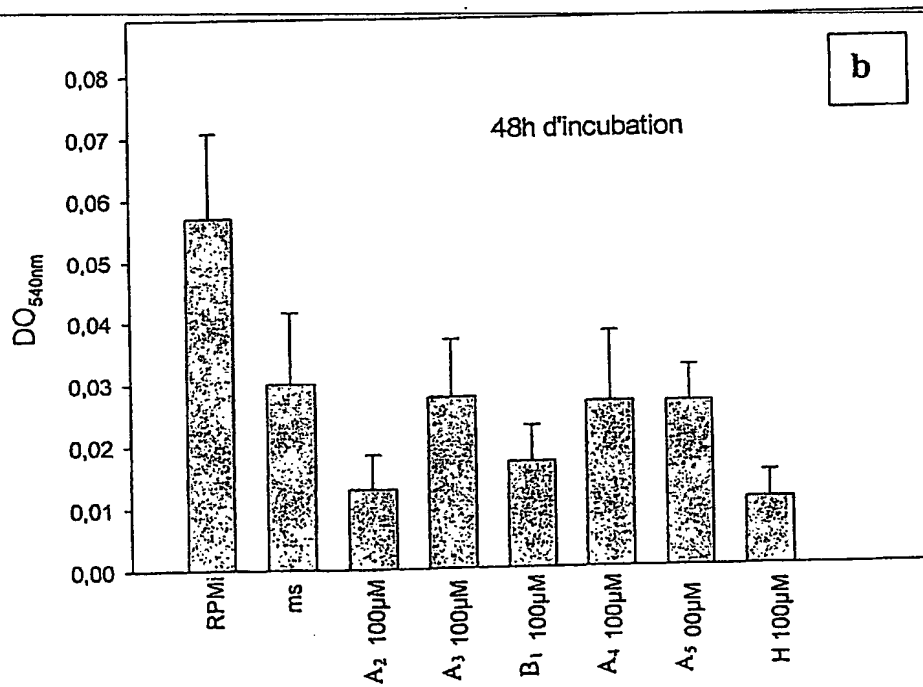
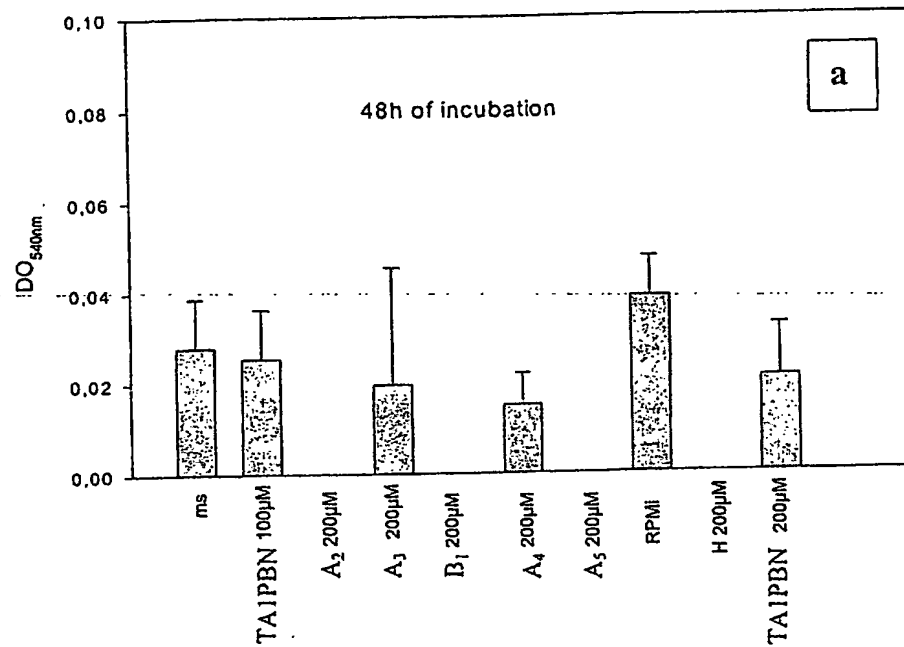
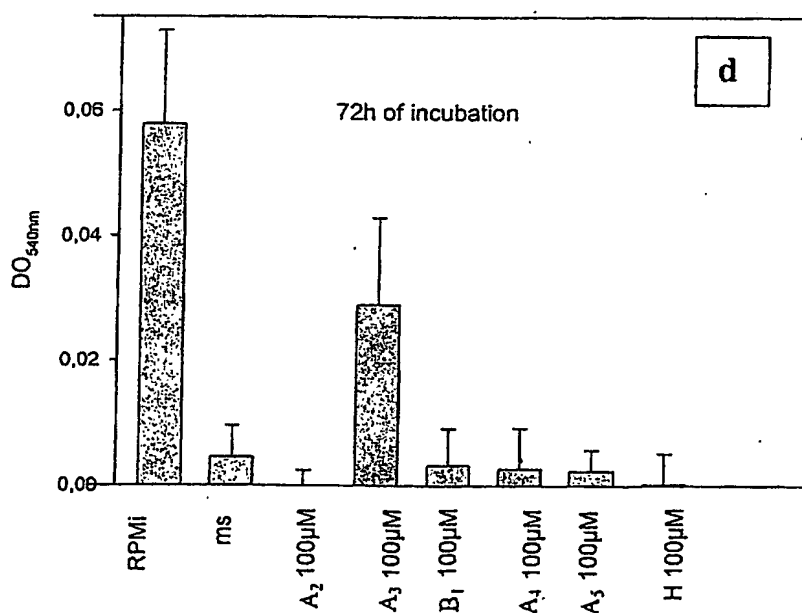
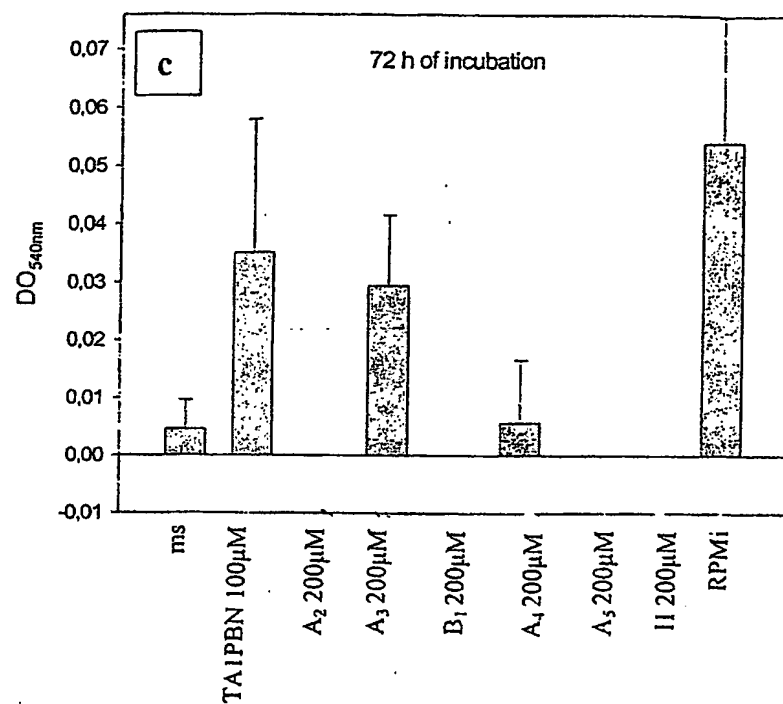


Figure 9 : Mesure de l'état d'apoptose par dosage ELISA de la fragmentation de l'ADN après lyse des cellules

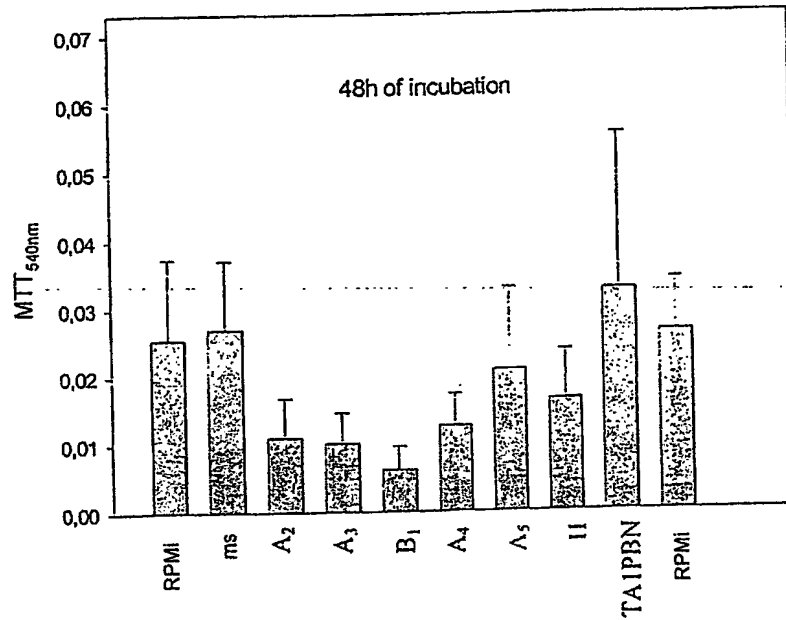


Figures 10a et 10b : Culture cellulaire NARP en présence de nitrones amphiphiles à 100 (a) et 200 µM (b) après 48h00 d'incubation

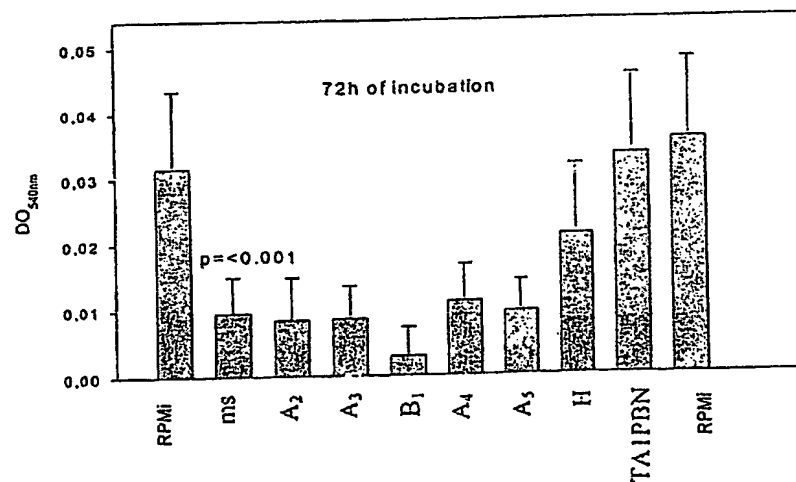


Figures 10c et 10d : Culture cellulaire NARP en présence de nitrones amphiphiles à 100 (d) et 200 μ M (c) après 72h00 d'incubation

e



f



Figures 10e et 10f : Culture cellulaire NARP en présence de nitrones amphiphiles à 50 μ M après 48h00 (e) et 72h00 (f) d'incubation

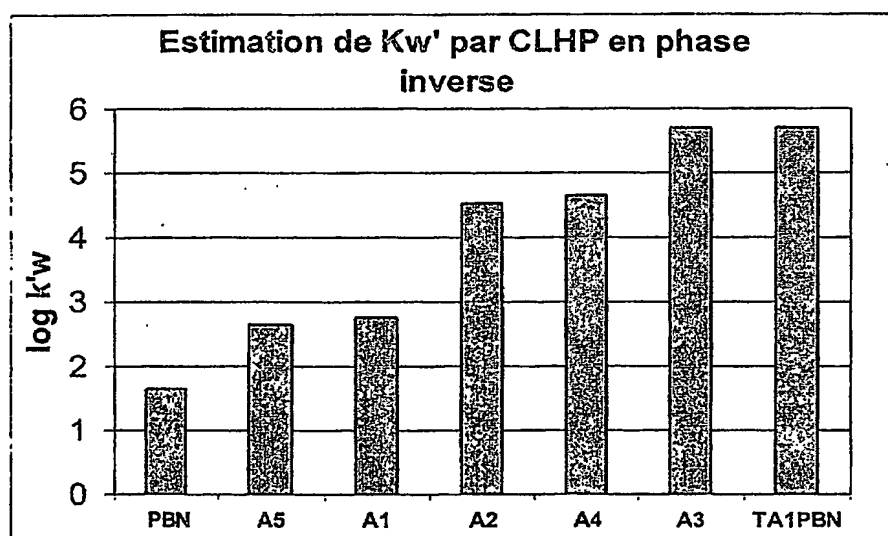


Figure 11: Variation de l'hydrophobie des nitrones d'origine lactobionique A1-A5.



DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ
Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

N° 11235°03

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1.../1...

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)

INV

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

08 113 Q W / 270601

Vos références pour ce dossier (facultatif)		VCcagF1578/1 FR
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		0214 078
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) NOUVEAUX DERIVES AMPHIPHILES DE L'ALPHA-C-PHENYL-N-tert-BUTYL NITRONE.		
LE(S) DEMANDEUR(S) : - SALLES Jean-Pierre agissant au nom et pour le compte de la Société dénommée TS PHARMA, Société en cours de formation. 830 Chemin de Vergon 13510 EGUILLES - UNIVERSITE D'AVIGNON ET DES PAYS DU VAUCLUSE 74, rue Louis Pasteur 84029 AVIGNON CEDEX 1		
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :		
<input checked="" type="checkbox"/> 1 Nom		DURAND
Prénoms		Grégory
Adresse	Rue	12, Avenue Louis Pasteur
	Code postal et ville	13 0 4 0 1 VILLENEUVE LEZ AVIGNON CEDEX
Société d'appartenance (facultatif)		
<input checked="" type="checkbox"/> 2 Nom		POLIDORI
Prénoms		Ange
Adresse	Rue	16D, Avenue de la Synagogue
	Code postal et ville	18 4 0 0 0 AVIGNON
Société d'appartenance (facultatif)		
<input checked="" type="checkbox"/> 3 Nom		PUCCI
Prénoms		Bernard
Adresse	Rue	12, Avenue des Alpilles
	Code postal et ville	1 3 9 4 0 MOLLEGES
Société d'appartenance (facultatif)		
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.		
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) Béatrice ORES N° 92-4046		

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire.
Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.